Aus dem histologischen Institut der anatomischen Anstalt
der Universität München.

Ueber den

Mikroskopischen Nachweis von Oxydase in Gewebsschnitten.

Mit einem Anhang über Vitalfärbung.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karl Kriegbaum.

München 1914
Akademische Buchdruckerei von F. Straub.

Aus dem histologischen Institut der anatomischen Anstalt
der Universität München.

Ueber den

Mikroskopischen Nachweis von Oxydase in Gewebsschnitten.

Mit einem Anhang über Vitalfärbung.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karl Kriegbaum.

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

München 1914
Akademische Buchdruckerei von F. Straub.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität München.

Referent:

Herr Professor *Dr. Mollier.*

Sonderabdruck aus den Abhandlungen der math.-phys. Klasse der K. Bayer. Akademie der Wissenschaften
XXVII. Band. 1. Abhandlung.

Einleitung.

Die histologische Technik hat sich in den letzten Dezennien zu einem umfangreichen Gebäude entwickelt und man kann ruhig behaupten, daß die Fortschritte auf rein morphologischem Gebiete dadurch sehr erfreuliche Resultate aufzuweisen haben. Andererseits muß freilich auch zugegeben werden, daß gerade deshalb in der Erforschung mikrobiologischer Fragen, d. h. in der mikroskopischen Untersuchung biologischer und chemischer Vorgänge an der überlebenden Zelle lange Zeit ein bedauerlicher Stillstand eingetreten war. Es mag dies vielleicht verwunderlich erscheinen, wenn man bedenkt, daß schon vor mehr als 25 Jahren Ehrlich in seiner genialen Arbeit über das „Sauerstoffbedürfnis des Organismus" an dem Beispiel der Zellatmung gezeigt hat, welche Menge von interessanten Problemen hier noch der Erklärung harren. Leider ist der von Ehrlich angezeigte Weg in der folgenden Zeit nicht allzu häufig weiter verfolgt worden; der Hauptgrund für diese befremdende Tatsache mag wohl in der Schwierigkeit der Technik, welche hier stets die Untersuchung lebend frischer Organe voraussetzt, liegen. In der neueren Zeit hat sich nun in dieser Hinsicht ein bemerkenswerter Umschwung vollzogen, und die Literatur von heute, welche sich mit der Untersuchung von Lebensäußerungen der Zelle befaßt, ist umfangreich und auf den ersten Blick erdrückend geworden.

Vor allem lassen sich bis jetzt drei Methoden unterscheiden, welche sich mit der mikroskopischen Prüfung vitaler Eigenschaften der Gewebe befassen: Die erste besteht in dem Nachweis der topographischen Verteilung der oxydierenden Fermente in den einzelnen Gewebsbestandteilen, die zweite prüft das Verhalten des lebenden Organismus gegenüber gewissen Farbstoffen (Vitalfärbung), die dritte endlich bringt das überlebende Gewebe mit Farbstoffen zusammen und sucht auf diesem Wege neue Gesichtspunkte zu gewinnen (Supravitalfärbung). In der Tat ist auch bereits durch diese drei Methoden

eine beträchtliche Menge neuer Tatsachen zu Tage befördert worden, wenn auch zugegeben werden muß, daß wir dabei noch vielfach mit unerklärten und bis jetzt unverständlichen Erscheinungen zu rechnen haben.

Als Hauptzweck der vorliegenden Arbeit habe ich es erachtet, zunächst für die bei der ersten Methode verwendeten Reagentien gewisse allgemeine Gesichtspunkte und Kriterien aufzustellen, die es ermöglichen, die Brauchbarkeit eines neuen Reagens von vorneherein abzuwägen. Es erschien mir dies um so wünschenswerter, da in letzter Zeit dem älteren Schulze-Winklerschen Reagens ein neues von Unna hinzugefügt wurde, welches in vielen, und wie es scheint grundsätzlich wichtigen Punkten, gänzlich abweichende Resultate gibt. Es soll daher an Hand der im allgemeinen Teil gefundenen Kriterien an zweiter Stelle untersucht werden, ob und wie weit das Unnasche Reagens den aufgestellten Forderungen entspricht. Als Anhang sollen sodann einige neue Beobachtungen aus dem Gebiete der Vitalfärbung (und zwar mit den neuen sauren Vitalfarbstoffen) folgen.

Allgemeiner Teil.

Kriterien über die Verwendungsfähigkeit eines Reagens zum Nachweis von Oxydase.

Bei dem mikroskopischen Nachweis von Oxydationsvorgängen in den Zellen und Geweben hat man zwei Möglichkeiten des Geschehens in Betracht zu ziehen: Entweder kann eine Oxydation zustande kommen durch den noch „intra vitam“ in den Zellen gespeicherten Sauerstoff, oder aber es wird der das Präparat umgebende Luftsauerstoff durch fermentative Wirkung der Zellen zur Oxydation des verwendeten Reagens herangezogen. Es frägt sich nun, ob es möglich ist, mittels unserer Sauerstoffreagentien diese beiden Arten der Oxydation nachzuweisen und, was noch viel wichtiger ist, auch vor allem von einander abzutrennen, zu unterscheiden, ob in dem einen Falle diese oder jene Art von Oxydation vorliegt.

Die Möglichkeit, daß sich in einem lebend warm entnommenen und sofort untersuchten Organstückchen noch Reste des intra vitam gespeicherten Sauerstoffes finden, ist jedenfalls nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen; auch Unna gibt dies zu (15): „Ich möchte durchaus nicht in Abrede stellen, halte es vielmehr für so gut wie sicher, daß das überlebende Gewebe an den Sauerstofforten noch Reste des intra vitam dort aufgespeicherten Sauerstoffes enthält.“

Ob es freilich gelingt, denselben mikrochemisch nachzuweisen, erscheint mir sehr unwahrscheinlich, es sei denn, daß man die ganze Untersuchung etwa in einem von Sauerstoff freien Gase vornehmen könnte, was aber rein technisch auf große Schwierigkeiten stoßen würde; nur so könnte man die zweite in Betracht kommende Möglichkeit ausschalten, daß nämlich der umgebende Luftsauerstoff, durch fermentative Wirkung der Zellen aktiviert, die Oxydation des Reagens bewirkt.

Günstiger liegen die Verhältnisse da, wo es sich handelt um den Nachweis eben dieser letztgenannten Oxydationsmöglichkeit, nämlich um Oxydasewirkung. Wenn es nämlich gelingt, ein Reagens zu finden, welches sich dem Luftsauerstoff gegenüber indifferent verhält oder nur äußerst langsam von demselben oxydiert wird, so sind wir unter Heranziehung aller übrigen Kriterien (Zerstörung der Oxydasewirkung durch Hitze, Protoplasma-Gifte) bei positivem Ausfall der Reaktion wohl berechtigt, im gegebenen Fall eine Oxydasewirkung anzunehmen.

Es soll nun im folgenden versucht werden, die Frage zu erörtern: Welche Eigenschaften muß ein Reagens besitzen, um wirklich zum mikroskopischen Nachweis von Oxydase brauchbar zu sein?

Als selbstverständlich und nicht zu umgehen soll hier die eine Forderung vorangestellt werden, daß sich der Eintritt einer Reaktion im mikroskopischen Bild nur dann nachweisen, d. h. für das Auge sichtbar machen lassen wird, wenn damit die Bildung eines Farbstoffes verbunden ist (oder event. auch wenn wenigstens ein deutlicher Umschlag in der Färbung zustande kommt; diese letztere Möglichkeit wäre theoretisch wohl auch denkbar, kommt jedoch bei allen bisherigen Reagentien nicht in Betracht, da die verwendeten Leukoverbindungen alle nahezu farblos sind). Es handelt sich somit stets zunächst um farblose Verbindungen, welche sich in reduziertem Zustande befinden und dann durch Aufnahme von Sauerstoff in die dunklere, farbige Oxydationsstufe übergeführt werden.

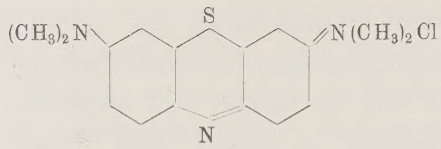
Hieran schließt sich ohne weiteres die Frage, inwieweit der aus dem Reagens gebildete Farbstoff event. selbst die eigentliche Oxydasereaktion beeinflußt, mit anderen Worten: ob der Farbstoff wirklich am Orte seiner Oxydation liegen bleibt oder etwa nachträglich an andere Stellen durch Diffusion hingelangt; bildet doch die Grundlage unserer ganzen histologischen Technik gewissermaßen die eine Erfahrungstatsache, daß verschiedene Farbstoffe auch nur zu verschiedenen, spezifischen Gewebsbestandteilen eine Affinität besitzen und niemals alle Teile des Gewebes gleichmäßig färben. Es liegt auf der Hand, daß diese im übrigen so wertvolle Eigenschaft in dem speziellen Falle,

wo es sich um den Nachweis von Oxydationsvorgängen handelt, die topographisch genau lokalisiert werden sollen, sehr unerwünscht ist. Denn angenommen, das verwendete Reagens gelangt nun in Form des reduzierten Leukofarbstoffes an irgend einen Gewebsbestandteil, der imstande ist, oxydierend zu wirken, so wird momentan wirklich an dem Orte des Geschehens eine Reaktion auftreten; wenn nun aber der durch Oxydation eben gebildete Farbstoff nicht Affinitäten zu dem Ort seiner Entstehung besitzt, so wird er alsbald durch Diffusion in das übrige Gewebe austreten und Stellen aufsuchen, zu welchen er größere Affinität besitzt; wir können also nicht ohne weiteres den Ort, an welchem wir im mikroskopischen Bild eine Färbung wahrnehmen, mit dem Orte der stattgehabten Oxydation identisch erklären.

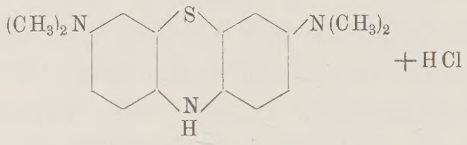
Ist es nun denkbar, daß auch die Leukoverbindung eines Farbstoffes, ähnlich wie eine farbige Oxydationsstufe Affinitäten zu bestimmten Gewebsbestandteilen besitzt? Diese Fragestellung könnte wohl unter Umständen ebenso von Bedeutung sein für die Brauchbarkeit eines Reagens auf Oxydationen. Diese Möglichkeit scheint bisher noch wenig in Betracht gezogen worden zu sein, ich finde in der Literatur nur eine diesbezügliche Angabe bei Michaelis „Einführung in die Farbstoffchemie“. Dieser spricht sich allerdings für das Gegenteil aus. Gelegentlich seiner Bemerkungen über die vitale Färbung des Nerven mit Methylenblau heißt es daselbst: „. . . Das Leukomethylenblau hat aber keine spezifische Verwandtschaft zu den Nervenfasern und diffundiert deshalb in das Gewebe hinein“. Ich möchte hier Veranlassung nehmen, eine Beobachtung mitzuteilen, welche doch mehr für das Gegenteil spricht; wenn es richtig ist, daß das Leukomethylenblau ganz allgemein ausgedrückt zu irgend welchen Gewebsbestandteilen keine Verwandtschaft besitzt, so muß es auch gelingen, dasselbe aus dem Gewebe ebenso leicht wieder auszuwaschen, als es in dasselbe eingedrungen ist, soferne man nur seine vorzeitige Oxydation zu dem blauen Farbstoffe verhindert. Dies läßt sich durch folgende Versuchsanordnung erreichen: Ein Gefrierschnitt eines frischen Organs wird für kurze Zeit (1 Minute) in eine Lösung von Leukomethylenblau gebracht, so daß er sich mit demselben imbibieren kann. Der Auswaschung der unveränderten Leukobase stehen nun zwar insofern Schwierigkeiten entgegen, als selbst destilliertes Wasser immer noch genügend Luftsauerstoff enthält, um während Vornahme dieses Prozesses eine teilweise Oxydation zu bewirken; man kann aber diese Schwierigkeit leicht dadurch umgehen, daß man dem Waschwasser eine Spur einer reduzierenden Substanz (z. B. Hydrosulfit) zusetzt. Hat man nun den Gewebsschnitt in diesem Wasser gründlich ausgewaschen und setzt ihn jetzt der Einwirkung der Luft auf dem Objektträger aus, so zeigt

sich bald eine zunehmende Blaufärbung des Schnittes, die sich unter dem Mikroskop als eine distincte Färbung einzelner Gewebsbestandteile erweist. Ich kann mir dieses Resultat nur so deuten, daß eben das Leukomethylenblau von bestimmten Teilen des Gewebes in irgend einer Weise, sei es nun physikalisch oder chemisch, fester gebunden war, so fest, daß es an diesen Stellen der Auswaschung standhielt; denn wäre es durch die Wasserbehandlung überall gleichmäßig extrahiert worden, so könnte nachträglich keine Bläuung mehr auftreten.

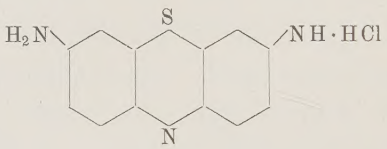
Doch abgesehen von diesem praktischen Versuche, der nur dazu beitrug, meine anfängliche Vermutung zu bestärken, scheint es mir auch theoretisch ganz plausibel, daß ein Leukofarbstoff Affinitäten zu Gewebsbestandteilen besitzt. Zur näheren Erläuterung mögen an dieser Stelle einige wichtige Punkte der Farbstoffchemie vorausgeschickt werden. Die Eigenfarbe eines organischen Körpers der aromatischen Reihe (denn nur diese Farbkörper kommen für unsere Zwecke in Betracht) ist geknüpft an die Anwesenheit eines bestimmten Atomkomplexes, man bezeichnet diesen als „chromophore Gruppe“, weil er gewissermaßen die Farbe in sich trägt. Es gibt mehrere solche chromophorer Gruppen, doch liegt es nicht im Rahmen dieser Betrachtung, sie einzeln auszuführen; als Beispiel möge hier nur die „Azogruppe“ angeführt werden: — N = N —. Also zwei dreiwertige Stickstoffatome, deren beide freie Valencen an je einen Benzolring gebunden sind. Die chromophore Gruppe macht den aromatischen Körper zum „Chromogen“, d. i. zum gefärbten Körper, nicht aber zum Farbstoff; während nämlich letzterer die Eigenschaft besitzt, andere Körper mit seiner Lösung zu färben, ist dies beim Chromogen nicht möglich. Das Chromogen wird zum Farbstoff erst durch den Hinzutritt der „salzbildenden Gruppe“; wie es verschiedene chromophore Gruppen gibt, so lassen sich auch verschiedene salzbildende Gruppen unterscheiden, und zwar saure und basische. Die Konstitution der verschiedenen salzbildenden Gruppen soll hier übergangen werden, das Wesentliche für die vorliegende Untersuchung ist lediglich die eine Tatsache, daß erst die Anwesenheit einer salzbildenden Gruppe im Molekül des gefärbten Körpers diesem die Fähigkeit verleiht, andere Körper mit seiner Lösung zu färben. Die Fragestellung wird daher in unserem Falle lauten müssen: „Wird bei der Reduktion eines Farbstoffes zum Leukokörper die salzbildende Gruppe zerstört oder bleibt sie bestehen?“ Ist das letztere der Fall, so ist die Annahme berechtigt, daß auch der Leukofarbstoff Affinitäten zum Gewebe besitzt. Um diese Frage zu beantworten, möge der Vorgang der Reduktion eines Farbstoffes an dem hier besonders naheliegenden Beispiel des Methylenblaues gezeigt werden; dieses leitet sich ab vom Thionin und besitzt die Formel:



= Methylenblau = Tetramethylthioninchlorid. Die Reduktionsstufe aller Farbstoffe besteht nun nicht, wie man annehmen könnte, in der Abgabe von Sauerstoff, sondern in der Aufnahme von H-Atomen. Demnach ergibt sich für das Leukomethylenblau (methylenweiß) die chemische Formel:



Um nun die hierbei vor sich gehende Veränderung für unsere Fragestellung richtig verwerten zu können, ist es nötig, auf die Konstitution des Methylenblaues noch mit einigen Worten zurückzukommen. Wie bereits oben erwähnt, leitet sich dasselbe ab vom Thionin. Das salzsaure Thionin besitzt die Formel:



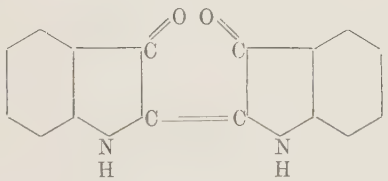
Es besitzt also zwei salzbildende Gruppen, wovon die eine Amidogruppe (NH_2) frei bleibt, während die zweite sich zum Salz neutralisiert hat. Es ist dies ein für viele Farbstoffe typisches Verhalten, das sich in folgendem Satze ausdrücken läßt: Tritt zu dem Molekül eines Farbstoffes eine zweite salzbildende Gruppe, so zeigt dieselbe wenig Neigung, sich zum Salz zu neutralisieren. Aber in einer anderen Richtung macht sich die Anwesenheit einer zweiten salzbildenden Gruppe häufig geltend, indem sie die Farbnuance des betreffenden Farbstoffes vertieft und ihm eine größere Färbekraft verleiht, da er eben durch sie stärker basisch bzw. sauer wird. Man bezeichnet daher weitere hinzutretende, salzbildende Gruppen auch als „auxochrome Gruppen". Substituiert man nun in der Formel des salzsauren Thionins die 4 an N gebundenen H-Atome durch Methylgruppen (CH_3), so gelangt man ohne weiteres zur Formel des Methylenblaues (siehe oben). Als salzbildende Gruppen figurieren daher beim Methylenblau die beiden Dimethylamidogruppen N $(CH_3)_2$. Wie bei der Amidogruppe, so erhält auch bei der Dimethylamidogruppe der N die Fähigkeit, zwecks Salzbildung von seiner dreiwertigen Form in die fünfwertige

überzugehen. Dementsprechend ist auch beim Methylenblau der auf der rechten Seite der Formel stehende N fünfwertig.

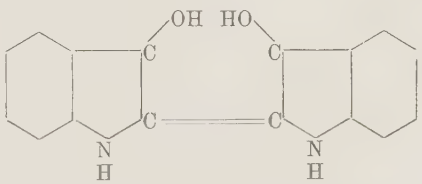
Wenn wir nun nach diesen Erläuterungen die beiden Formeln des Methylenblau und des Methylenweiß miteinander vergleichen, so zeigt sich, daß auch das letztere zwei salzbildende Gruppen enthält, welche nach den Gesetzen der Farbchemie die Fähigkeit, andere Körper zu färben, bedingen. Ich glaube daher annehmen zu dürfen, daß auch das Leukomethylenblau wohl Affinitäten zum Gewebe besitzt. Hingegen scheint es mir nicht ausgeschlossen, daß dasselbe gegenüber dem oxydierten Methylenblau etwas veränderte Affinitäten aufweist, wenn man nämlich in Betracht zieht, daß in der salzbildenden Gruppe auf der rechten Seite der Formel der N beim Methylenblau fünfwertig, beim Methylenweiß dagegen dreiwertig auftritt.

Ich möchte diese Frage nicht abschließen, ohne noch ein anderes Beispiel gebracht zu haben, welches mit Sicherheit zeigt, daß ein Leukofarbstoff sehr wohl Affinitäten zum Gewebe aufweisen kann, während seine Oxydationsstufe sogar diese nicht besitzt.

Der Indigo



enthält zwar eine chromophore Gruppe C=C, doch haben die beiden NH-Gruppen (welche bei anderen Farbstoffen sehr wohl als salzbildende Gruppen wirken können) in der Formel des Indigo keine Neigung, mit Säuren Salze zu bilden. Wenn man nun den Indigo reduziert, so geschieht dies wie bei allen Farbstoffen durch Aufnahme von H-Atomen:



Hierdurch werden dem Indigoweiß zwei salzbildende Gruppen (OH) verliehen, und tatsächlich wird nunmehr der Leukokörper von der Faser so fest gehalten, daß auch der nachträglich oxydierte Farbstoff haften bleibt, während man bekanntlich mit Indigoblau keine Färbung erzielen kann, da dasselbe eben nur ein Chromogen darstellt.

Aus dieser Überlegung ergeben sich ohne weiteres zwei wichtige Konsequenzen: einmal muß bei der Wahl des zu verwendenden Reagens stets genau geprüft werden, inwieweit hier etwa spezifische Gewebsaffinitäten mitwirken, welche mit der eigentlichen Oxydase-Reaktion nichts gemein haben; andererseits muß aber auch hervorgehoben werden, daß gerade dasjenige Reagens als Ideal zu bezeichnen wäre, welches nur zu den oxydativen Fermenten der Gewebe Affinitäten besitzt.

Leider wird nun gerade durch diese letztere Tatsache eine weitere Schwierigkeit zu der Beurteilung der ganzen Fragestellung hinzugefügt, denn was wissen wir heute über die chemische Konstitution der Zellfermente überhaupt Positives? Obwohl gerade in der letzten Zeit auf diesem Gebiet von zahlreichen Forschern sehr viel gearbeitet wurde, ist unser positives Wissen in dieser Hinsicht doch noch recht gering, davon zeugen am besten die verschiedenen zum Teil sich widersprechenden Theorien. Wird es unter solchen Umständen überhaupt möglich sein, zu entscheiden, ob ein Reagens spezifische Affinitäten zu den Oxydationsfermenten besitzt? Fast scheint es undenkbar, hier Kriterien aufzustellen; dennoch möchte ich auf einen Punkt hinweisen, der mir von großer Bedeutung zu sein scheint. Bald nach dem Bekanntwerden der Indophenolblau-Reaktion von Winkler wurde von verschiedenen Seiten darauf hingewiesen, daß es sich möglicherweise um eine einfache Fettfärbung handeln könnte. Diese Ansicht erschien um so mehr plausibel, als das Indophenolblau schon früher von Herxheimer für die histologische Technik als guter Fettfarbstoff empfohlen worden war. In der Tat kann man auch bei der Ausführung der Indophenolblau-Oxydase-Reaktion die Beobachtung machen, daß sich dabei auch das Fett färbt. Ich habe jedoch stets gefunden, daß der Farbton des eigentlichen Fettes ein ganz anderer und wohl zu unterscheiden ist von dem rein blauen Ton der wirklichen Oxydase-Granula, auch tritt die Färbung des Fettes immer erst etwas später auf, nachdem schon vorher die Granula ihren Farbton angenommen haben. Es ist dieser Vorgang ohne weiteres verständlich, wenn man bedenkt, daß sich nach kurzer Zeit in der Reaktionsflüssigkeit Spuren von Indophenolblau durch die energische Oxydase-Wirkung bilden, die dann natürlich von den Fettsubstanzen gespeichert werden; doch glaube ich, daß es wohl immer gelingen wird, diese beiden Vorgänge von einander zu unterscheiden und das um so leichter, als uns im Sudan jeder Zeit eine treffliche Kontrollfärbung zur Verfügung steht. Schwieriger liegen die Verhältnisse dann, wenn es sich darum handelt, auch eine Färbung lipoider Substanzen auszuschließen. Die Möglichkeit, daß es sich bei Winklers Reaktion um eine Lipoidfärbung handelt, ist eingehend von

Dietrich (2) diskutiert worden, welcher zu folgender Anschauung gelangt: „Ist somit die Bildung des Naphtholblaues (Verfasser meint das Indophenolblau bei der Reaktion von Winkler, Naphtholblau ist dem Indophenolblau nicht gleich zu setzen und hat mit der Winklerschen Reaktion nichts zu tun!) zum wesentlichen Teil bedingt und gefördert durch eine überlebende Fähigkeit, bzw. fermentativ wirkende Substanzen in der Zelle, so läßt sich aus der Lokalisation der Färbung auf die Lagerung solcher wirksamen Bestandteile nicht schließen. Der gebildete Farbstoff wird vielmehr von den fettartigen Elementen aufgenommen, und wohl auch aufgespeichert". Mit anderen Worten: Dietrich glaubt auf Grund seiner Untersuchungen annehmen zu müssen, daß es sich nur um eine Färbung lipoider Substanzen handle, daß die Orte der Farbstoffspeicherung nicht identisch seien mit dem Sitz der Oxydasewirkung. Er hat jedoch eine zweite Möglichkeit, welche wohl ebenso berechtigt ist, nicht in Betracht gezogen: Man könnte doch auch annehmen, daß die Zelloxydase gerade an das Vorhandensein lipoider Substanzen gebunden ist. Daß eine derartige lipoide Hülle sehr wohl denkbar ist, lehrt uns ohne weiteres das Beispiel der roten Blutkörperchen, welche ja zwar mit der Zelloxydase nichts gemein haben, aber bei den Oxydationsvorgängen im Organismus doch eine wichtige Rolle spielen. Nun ist in letzterer Zeit eine sehr exakte, experimentelle Arbeit von H. M. Vernon (20) erschienen, welche sich mit der „Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden" eingehend befaßt. Ich halte dieselbe für wichtig genug, um einiges daraus wiederzugeben:

„Narcotica lassen bis zu einer gewissen Konzentration die oxydierende Kraft der Gewebe unbeeinträchtigt oder erhöhen dieselbe. Bei größerer Konzentration des Narcoticums erleidet die Oxydase Schädigungen. Die doppelte oder dreifache Konzentration der Anfangswirkung zerstört sie vollständig. Gifte, abgesehen von lipoidlöslichen Stoffen, haben einen viel ausgedehnteren Wirkungsbereich auf die Oxydase. So ist die Formaldehyd-Konzentration, welche die Oxydase gänzlich inaktiviert, 1330 mal so groß wie die zuerst einwirkende.

Die Konzentrationen der Narcotica, welche die Anfangswirkung verursachen, sind nur wenig höher als diejenigen, welche rote Blutkörperchen lackfarben machen. Daraus läßt sich die Folgerung ableiten, daß die Wirkung der Indophenoloxydase von Lipoiden abhängig ist, vielleicht von Lipoidmembranen, welche die Gewebsoxygenase und Peroxydase zusammen halten und ihre gemeinsame enzymatische Tätigkeit ermöglichen."

Es ist klar, daß diese Resultate für unsere Fragestellung nach den Kriterien des zu verwendenden Reagens von größter Bedeutung sind. Wenn es

erwiesen ist, daß die Oxydasewirkung tatsächlich aufs engste mit lipoiden Substanzen verknüpft ist, so kommen als Reagens die lipoidlöslichen Farbstoffe bzw. deren Leukokörper in Betracht. Nun besitzen zwar zahlreiche Farbstoffe einen geringen Grad von Lipoidlöslichkeit, als eigentliche Fettfärber sind jedoch vor allem die indifferenten Farbstoffe zu bezeichnen. Als indifferente Farbstoffe faßt Michaelis alle diejenigen Farbstoffe zusammen, welche keine salzbildende Gruppe besitzen; es wären also hierhin auch die reinen Chromogene zu rechnen. Bezüglich des genaueren muß auf Michaelis verwiesen werden. Ferner zeigen fettfärbende Eigenschaften die sogenannten amphoteren Farbstoffe: Finden sich an einem Chromogen mehrere salzbildende Gruppen in der Weise, daß sich die sauren und die basischen Gruppen das Gleichgewicht halten, so resultiert hieraus ein Farbstoff, welcher zugleich die Eigenschaften der sauren und basischen Farbstoffe besitzt, der „amphotere Farbstoff". Von dem Satz, daß das zu verwendende Reagens keine spezifischen Gewebsaffinitäten besitzen darf, wäre also die eine Ausnahme zu machen, daß Fettfärber unter Umständen sogar vorteilhaft sein können, nämlich unter der Voraussetzung, daß die Oxydasewirkung tatsächlich aufs engste verknüpft ist mit gewissen Substanzen von fettartiger Beschaffenheit. Für die Indophenoloxydase scheint dieser Zusammenhang mit Lipoiden durch die oben zitierte Arbeit von Vernon so gut wie bewiesen.

Endlich ist noch einer weiteren Forderung zu gedenken, welche meines Erachtens bei Ausführung der Oxydasereaktion nicht übersehen werden darf. Nakano (8) macht gelegentlich der Besprechung der Pappenheimschen Modifikation der Oxydasereaktion die Angabe, daß „alte Lösungen die Reaktion schneller und stärker" herbeiführen. Ich möchte vor der praktischen Verwertung dieser Angabe warnen und sogar empfehlen, stets möglichst frisch bereitete Reagentien anzuwenden, und zwar aus folgendem Grunde: Schönbein hat meines Wissens zuerst darauf hingewiesen, daß Guajaktinktur und überhaupt die Phenolasereagentien bei Berührung mit dem Sauerstoff der Luft Peroxyde bilden. Bach (1) hat in neuester Zeit sich dahin ausgesprochen: „Die Phenolasereagentien — Guajaktinktur, Hydrochinon, Pyrogallol, Guajakol, Paraphenylendiamin usw. — gehören ausnahmslos zu den oxydierbaren Stoffen, die den molekularen Sauerstoff unter Peroxydbildung aufnehmen. Werden zum Nachweis der Peroxydase nicht frisch dargestellte, sondern teilweise oxydierte und daher bereits peroxydhaltige Reagentien verwendet, so wird das vorhandene Peroxyd durch die Peroxydase zur Oxydation des Reagens befähigt, wobei die Wirkung der Phenolase durch die des Systems Peroxydase + Peroxyd vorgetäuscht wird. Auf richtig bereitete Reagentien übt Peroxy-

dase nicht die mindeste Einwirkung aus, so lange in diesen kein Peroxyd nachweisbar ist.“ Da nun wahrscheinlich die Peroxydase im Organismus häufig im innigen Zusammenhang mit Oxygenase vorkommt (Vernon nimmt eine Verbindung beider mittels einer lipoiden Hülle an), so ist es ohne weiteres klar, daß alte peroxydhaltige Reagentien zu verwerfen sind, wo es sich um den mikroskopischen Nachweis von Oxydase handelt.

Zusammenfassung.

Aus obigen Betrachtungen lassen sich also folgende Forderungen für die Beschaffenheit eines Reagens auf Oxydase ableiten:

I. Es muß die oxydierende Wirkung des molekularen Luftsauerstoffes ausgeschlossen werden können, d. h. die Oxydation des Reagens darf sich an der Luft nur sehr viel langsamer vollziehen, als an dem zu untersuchenden Gewebsschnitt, da es sonst nie möglich ist, zu unterscheiden, ob eine Oxydation auf Kosten der Gewebsoxydase oder eine einfache Oxydation durch den molekularen Luftsauerstoff vorliegt.

II. Der als Reagens verwendete Farbstoff darf keine spezifischen Gewebsaffinitäten besitzen; insbesondere ist die Tatsache in Betracht zu ziehen, daß auch die Leukoverbindung eines Farbstoffes Affinitäten zu Gewebsteilen besitzen kann, was aus der Beobachtung hervorgeht, daß z. B. Leukomethylenblau sich aus dem Gewebe nicht mehr auswaschen läßt.

III. Von der eben aufgestellten II. Forderung ist eine Ausnahme zu machen, wenn es sich um Fettfärber handelt; da es nun so ziemlich erwiesen ist, daß die Oxydasewirkung an gewisse noch nicht näher bekannte Lipoidsubstanzen gebunden ist, so steht der Verwendung dieser Farbstoffe nichts im Wege, soferne sie der Forderung I gerecht werden.

IV. Das verwendete Reagens muß frei sein von Peroxyden, da sonst die in jedem Gewebsschnitt vorhandene Peroxydase in Reaktion tritt und möglicherweise die Wirkung der Oxydase vortäuscht. Dieser Forderung kann man jeder Zeit leicht dadurch genügen, daß man nur frisch bereitete Lösungen verwendet.

Entspricht also ein Reagens diesen vier Bedingungen, so kann es (unter Heranziehung anderweitiger Kriterien für Oxydase, Verhalten gegen Hitze, Protoplasmagifte usw.) zur mikroskopischen Untersuchung auf Oxydase verwendet werden. Es soll nun im folgenden untersucht werden, inwieweit das Unnasche Rongalitweiß diesen Anforderungen entspricht.

Über P. G. Unnas Rongalitweiss.

Rongalitweiß (aus Methylenblau durch Reduktion mit Rongalit entstanden) nennt Unna (15) ein von ihm empfohlenes Reagens zur Darstellung der „Sauerstofforte" des tierischen Gewebes. Schon in dem von Unna selbst gewählten Ausdruck der „Sauerstofforte" liegt eine gewisse Reserviertheit, indem hierdurch (zunächst wenigstens) weder behauptet wird, daß es sich dabei um eine Oxydase-Reaktion handelt, noch über die Art und Weise der Sauerstoffbindung im Gewebe etwas bestimmtes ausgesagt ist. Im weiteren Verlauf seiner Untersuchungen spricht sich jedoch Unna ziemlich bestimmt dahin aus, daß es sich bei seiner Reaktion insbesondere bei der Färbung der Kerne um eine Oxydasewirkung handelt; so heißt es z. B. in Abschnitt 6 (Kritik der bisher befolgten Methode): „. . . Steht es nunmehr fest, daß die Sauerstofforte nicht oder wenigstens nicht nur als Sauerstoffansammlungen wirken, sondern als echte Katalysatoren, die den molekularen Luftsauerstoff zu aktivieren vermögen . . ." Desgleichen in Abschnitt 11 (das Wesen der Sauerstofforte): „Die bisher gewürdigten Tatsachen machen allerdings das Vorhandensein einer Oxydase im Kern in hohem Grade wahrscheinlich."

Diese beiden Äußerungen sprechen sich immerhin so deutlich nach einer bestimmten Anschauung hin aus, daß es wohl berechtigt sein wird, nachzuprüfen, ob die Unnasche Methode das leistet, was von einem derartigen Reagens verlangt werden muß; ich glaube mich dazu umsomehr berechtigt, da ein einfacher Vergleich der nach Unna erhaltenen Bilder mit dem Färbungsresultat der Schultzeschen Oxydase-Reaktion die größten Gegensätze erkennen läßt. Es spricht ja diese Verschiedenheit der Resultate nicht ohne weiteres gegen eine der beiden Reaktionen, seit wir wissen, daß es im Körper nicht „die Oxydase" sondern vielleicht sehr vielerlei Oxydasen gibt; immerhin bleibt aber diese Verschiedenheit der Reaktion erst recht ein Grund, welcher uns zur Vorsicht und zu kritischer Nachprüfung mahnt. Es muß auffallen, daß sich bisher so wenige Autoren mit der Nachprüfung der Unnaschen Reaktion befaßt haben, während die Schultzesche Oxydase-Reaktion schon so zahlreiche Bearbeitungen erfuhr. Erst in der letzten Zeit erschien eine eingehende Arbeit von Oelze (10), welche gegen die Unnasche Reaktion Stellung nimmt; dieselbe enthält einige Versuche, welche auch ich bereits im Sommer vorigen Jahres in ähnlicher Weise ausführte und welche mich auch zu ähnlichen Schlüssen veranlaßten, wie sie Oelze in seiner Arbeit zieht. Leider war ich gezwungen, meine Untersuchungen in dieser Richtung auf längere Zeit zu

unterbrechen, so daß ich mich jetzt in einigen Punkten darauf beschränken kann, die übereinstimmenden Resultate Oelzes zu bestätigen und nur noch einzelne neue Beobachtungen hinzuzufügen. Zunächst soll nun versucht werden, klarzulegen, ob und wie weit das Unnasche Reagens den im allgemeinen Teile aufgestellten Forderungen entspricht.

Die erste Bedingung, daß nämlich das Reagens dem molekularen Luftsauerstoff gegenüber unempfindlich sein muß, scheint beim Rongalitweiß erfüllt zu sein. Es stellt sich nämlich dar als eine schwach gelbliche Lösung, welche auch bei langem Stehen an der Luft wenig Neigung zeigt, sich zu oxydieren; dennoch muß darauf hingewiesen werden, daß diese Unempfindlichkeit nur eine scheinbare ist; in Wirklichkeit kann nämlich das reine Leukomethylenblau nicht an der Luft bestehen, es oxydiert sich sofort zu dem blauen Farbstoff. Diese leichte Oxydierbarkeit ist im Unnaschen Reagens unterdrückt durch einen starken Überschuß des Reduktionsmittels Rongalit; wie bedeutend dieser Überschuß an reduzierender Substanz ist, geht am besten aus folgendem Versuch hervor.

Die Originalvorschrift des Unnaschen Reagens lautet:

Methylenblau	0,2
Rongalit	0,4
Salzsäure (25%) . . .	4 Tropfen
Wasser	10,0.

Stellt man nun folgende zwei Lösungen her:

I. 2%ig wässer. Lösung von Methylenblau } entsprechend dem % Gehalt bei-
II. 4%ig wässer. Lösung von Rongalit } der im Unnaschen Reagens,

so müßten bei entsprechendem HCl-Zusatz gleiche Teile beider Lösungen zur Reduktion nötig sein; in Wirklichkeit genügen jedoch 7 Tropfen von Lösung II, um 2 ccm von Lösung I nach entsprechender Ansäuerung und Erwärmen zur Reduktion zu bringen. Da nun 7 Tropfen der Lösung II erst knapp einem halben Kubikzentimeter entsprechen, so geht daraus hervor, daß im Unnaschen Reagens das Rongalit in einer reichlich viermal so großen Menge vorhanden ist, als sie zur Reduktion des vorgeschriebenen Quantums Methylenblau nötig wäre! Solche Mengen reduzierender Substanz können wohl kaum ohne Beeinträchtigung des Gewebes (es handelt sich doch um frische Organschnitte) angewendet werden, und es läßt sich schwer annehmen, daß die Zellen hierdurch nicht in ihrem vitalen Verhalten beeinträchtigt werden.

Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Wirkungsweise des verwendeten Reduktionsmittels begründet. Rongalit, das Natriumsalz der Sulfoxylsäure in

Verbindung mit Formaldehyd unterscheidet sich von anderen Reduktionsmitteln dadurch, daß es seine reduzierende Wirkung erst bei Temperaturen von 70 bis 80° entfaltet. Setzt man jedoch etwas Säure zu dem zu reduzierenden Farbstoff, so erfolgt die Reduktion bereits bei gewöhnlicher Temperatur. Die saure Reaktion hält also gewissermaßen die reduzierende Wirkung des Rongalit „aktiv". Es ist dies ein zweites Moment, welches die Brauchbarkeit des Rongalitweiß beeinträchtigt; wird nämlich diese saure Reaktion durch Alkalien aufgehoben, so tritt momentan Blaufärbung auf. Man kann sich davon leicht überzeugen, wenn man auf Filtrierpapier einen Tropfen der sauren Rongalitweißlösung bringt; man kann dieses Papier trocknen lassen, ohne daß eine Oxydation seitens der Luft eintreten würde; bringt man aber dazu eine Spur einer ganz verdünnten Natronlauge, so färbt sich die berührte Stelle augenblicklich blau. Daß diese Tatsache auch Unna bekannt ist, geht aus einer anderen Arbeit dieses Autors hervor, in welcher er das mit Rongalitweiß imprägnierte Filtrierpapier als Reagens zur Prüfung des Oxydationsvermögens der Hautsekrete empfiehlt. Es heißt daselbst: „Alkalien bewirken ebenfalls eine Bläuung, aber (wie es scheint) nicht direkt, sondern indirekt. Wir haben nämlich in der Lösung neben Methylenweiß die freie Formaldehydsulfoxylsäure, denn die gebildete Ameisensäure oder H_2SO_4 bindet einen Teil des Natriums des Rongalit und macht etwas Säure frei. Diese stark reduzierende Säure vermag schon in der Kälte der Oxydation seitens der Luft das Gegengewicht zu halten. Wenn aber Alkali dazukommt und diese Säure bindet, so kann der Luftsauerstoff ungehindert seine oxydierende Wirkung entfalten. Also auch hier hat man darauf zu achten, ob die zu prüfende Substanz sauer oder alkalisch ist, da in letzterem Falle möglicherweise eine Oxydation seitens der Luft vor sich geht." Merkwürdigerweise erwähnt Unna diese Möglichkeit einer Fehlerquelle in seiner Arbeit über die „Sauerstofforte" (15) mit keinem Wort. Ob die Alkalien die Bläuung (wie sich Unna ausdrückt) direkt oder indirekt bewirken, scheint mir für das Wesen der Reaktion ziemlich gleichgültig zu sein und ändert nichts an der Tatsache, daß damit dem Reagens gewissermaßen eine neue unbekannte Größe hinzugefügt ist, welche die Beurteilung der Oxydationsvorgänge mindestens erschwert.

An zweiter Stelle war im allgemeinen Teil die Forderung aufgestellt worden, daß der verwendete Farbstoff keine spezifischen Affinitäten zu bestimmten Gewebsbestandteilen besitzen darf. Es genügt hier wohl auf das Kernfärbungsvermögen und auf die Affinität zu Mastzellgranulis beim Methylenblau hinzuweisen, um zu erläutern, daß dasselbe spezifische Affinitäten sehr wohl besitzt; daß solche Affinitäten auch gegenüber lebendem und über-

lebendem Gewebe vorhanden sind, beweist weiterhin die vitale Nervenfärbung, sowie die Darstellung verschiedener Zellgranula durch Methylenblau bei vitaler Färbung. Endlich habe ich bereits im allgemeinen Teil gerade an der Hand des Methylenblaues zu zeigen versucht, daß wohl auch die Leukobase Gewebsaffinitäten besitzt. Es soll an dieser Stelle nur nochmals darauf hingewiesen werden, daß diese Annahme begründet wurde 1. durch das feste Haften des Leukomethylenblaues gegenüber Auswaschung und 2. durch die chemische Konstitution desselben. Andererseits scheint allerdings das Leukomethylenblau andere Affinitäten zum lebenden Gewebe zu besitzen, als das Methylenblau; wie endlich das Methylenblau zum fixierten Objekt (wie jeder andere Farbstoff) sich grundsätzlich verschieden verhält, als zum lebenden, so ist dieses abweichende Verhalten auch vom Leukofarbstoff zu erwarten; in der Tat gibt ja auch der fixierte und mit Rongalitweiß behandelte Schnitt ein ganz anderes Resultat. Durch diese Überlegungen dürfte eine Reihe von Punkten, welche Unna für seine Annahme anführt, daß es sich bei der Rongalitweißmethode um eine Färbung der Sauerstofforte handelt, in Frage gestellt werden. Zunächst sucht Unna die Möglichkeit auszuschließen, daß es sich bei der Färbung der Kerne um eine gewöhnliche Kernfärbung handeln könnte, indem er die Frage aufwirft: „Ist es ausgeschlossen, daß sich während des nachherigen Auswaschens in (lufthaltigem) Wasser aus dem Rongalitweiß Methylenblau schon außerhalb des Gewebes bildet, welches dann natürlich sofort eine blaue Kernfärbung wie gewöhnlich bewirken würde?“ Diesen Einwand sucht Unna zu entkräften mit dem Hinweis darauf, daß dies bei richtiger Ausführung der Methode nicht möglich sei: „der Schnitt kommt direkt aus dem Rongalitweiß in ein größeres Schälchen mit destilliertem Wasser, in dem er rasch hin und her bewegt wird. Das überschüssige Methylenweiß, welches das Wasser dem Schnitt entzieht, mischt sich nun mit dem ebenfalls austretenden Rongalitüberschuß und wird ohne Entstehung einer Bläuung abgespült. Der Schnitt, welcher sich dabei allmählich stellenweise blau färbt, befindet sich mithin keinen Augenblick in einer von Methylenblau gefärbten Umgebung“. Damit ist allerdings der eine Einwurf entkräftet, daß das in dem Waschwasser gebildete Methylenblau als solches sekundär eine Kernfärbung bedingt; doch scheint mir diese Möglichkeit überhaupt ziemlich ferne zu liegen, daß erst das durch Oxydation außerhalb des Gewebes entstandene Methylenblau eine Kernfärbung bewirken könne. Wenn man andererseits annimmt (und zu dieser Annahme berechtigen die Ausführungen im allgemeinen Teil immerhin), daß das Leukomethylenblau wie das Methylenblau selbst von den Zellkernen begierig festgehalten wird, während es z. B. in anderen Gewebsbestandteilen nur

locker sitzt, so ist es ohne weiteres klar, daß nach erfolgter Auswaschung (auch wenn genau nach Unnas Vorschrift vorgegangen wurde) ein Bild resultiert, das einer Kernfärbung mit Methylenblau vollständig entspricht. Wenn man sich also auf den immerhin ebenso berechtigten Standpunkt stellt, daß die Leukokörper von Farbstoffen ebenfalls Gewebsaffinitäten besitzen können, so wird die obige Beweisführung Unnas ihre Kraft verlieren müssen.

Einen weiteren Beweis für seine Behauptung, daß die Kernfärbung keine gewöhnliche Methylenblaufärbung sei, sucht Unna in der „besonderen Empfindlichkeit der Färbung, die der gewöhnlichen Färbung mit Methylenblau nicht zukommt". Diese besondere Empfindlichkeit äußert sich nach Unna in der „Vernichtung der Sauerstofforte durch Hitze, neutrale Salze, Alkohol, Phenole und andere Protoplasmagifte". Demgegenüber ist zu erwähnen, daß es auch bei der gewöhnlichen Methylenblaufärbung von großem Unterschied ist, ob man die Färbung am überlebenden oder an einem durch chemische oder physikalische Agentien alterierten oder gar abgetöteten Gewebe vornimmt. Warum sollte nicht auch das Leukomethylenblau gegenüber lebendem und totem Gewebe sich verschieden verhalten? Ich glaube, daß gerade hierin der wichtigste Fehler der Rongalitweißmethode zu suchen ist.

Die dritte der im allgemeinen Teil aufgestellten Forderungen war die, daß der als Oxydase-Reagens verwendete Farbstoff der Gruppe der indifferenten Farbstoffe angehören soll; begründet wurde die Forderung einerseits durch die Tatsache, daß die Oxydasewirkung nach den neuesten Untersuchungsergebnissen aufs engste geknüpft ist an gewisse Lipoidsubstanzen und daß andererseits gerade die indifferenten Farbstoffe sich durch Lipoidlöslichkeit auszeichnen. Das Methylenblau mit seinem ausgesprochenen basischen Charakter entspricht natürlich dieser Forderung nicht. Hiergegen wäre nun allerdings ein Einwand zu machen: Das Methylenblau eignet sich bekanntlich (wie auch viele andere basische Farbstoffe) sehr gut zur Supravitalfärbung; es lassen sich damit vor allem die Leukocytengranulationen am unfixierten Abstrich- und Schnittpräparat darstellen. Nun spielt aber nach den neueren Anschauungen bei der Supravitalfärbung gerade die Farbstoffspeicherung in lipoiden Membranen eine wichtige Rolle; nach Pappenheim (11) u. a. handelt es sich hier „um eine Speicherung basischer Farbstoffe in (der lipoiden Hülle) der präformierten Granulationen". Nun zeigt aber das Methylenblau selbst keine Löslichkeit in lipoidlösenden Stoffen; schüttelt man eine gesättigte wässerige Lösung von Methylenblau mit etwas Chloroform durch, so nimmt dasselbe zwar meist eine leichte Färbung an, die jedoch nur auf Verunreinigungen des Farbstoffes zurückzuführen ist. Es scheint also hier ein Widerspruch zu be-

stehen zwischen der Lipoidunlöslichkeit des Methylenblaues einerseits und seiner Fähigkeit supravital die lipoiden Hüllen der Granulationen zu färben, andererseits. Es ist das Verdienst von Overton (9), diese Frage geklärt zu haben; er hat gezeigt, daß Lecithin, Protagon und Cerebrin in sehr verdünnten Lösungen der basischen Anilinfarben suspendiert, diese Farbstoffe reichlich speichern. Man kann nun eben diese basischen Farbstoffe auch in Chloroform, Benzol, etc. zur Lösung bringen, wenn sich darin eine der drei genannten Verbindungen in Lösung befindet. Daraus geht hervor, daß die gespeicherten Farbstoffe in Form einer starren Lösung vorhanden sein müssen. „Die Speicherung ist nichts anderes als die Verteilung des Farbstoffes zwischen einem flüssigen und einem festen Lösungsmittel, wobei das letztere das viel größere Lösungsvermögen für die betreffenden Farbstoffe besitzt“ (Overton). Es könnte nun nach diesen Erwägungen den Eindruck machen, daß die oben von mir aufgestellte Forderung, daß für die Oxydase-Reaktion die indifferenten und amphoteren Farbstoffe in erster Linie in Betracht kommen, überflüssig wäre; demgegenüber ist zu bemerken, daß gerade den indifferenten Farbstoffen die in diesem Falle so wertvolle Eigenschaft zukommt, außer ihrer Lipoidlöslichkeit keine spezifischen färberischen Qualitäten gegenüber dem Gewebe zu besitzen. Es soll diese Frage weiter unten nochmals beleuchtet werden bei Besprechung einer neuen Reaktion mit Indigoweiß.

Der 4. Forderung für ein Oxydase-Reagens, daß es nämlich keine Peroxyde enthalten soll, kann auch beim Unnaschen Reagens leicht nachgekommen werden, indem eben nur frisch bereitete Lösungen verwendet werden.

Einige Betrachtungen über die mit Rongalitweiss erzielten Färbungsresultate.

Versuch: Man bringt in das Unnasche Rongalitweiß einen beliebigen Schnitt eines lebend-frischen Organes und gleichzeitig damit ein ebenso großes Stückchen reines Filtrierpapier. Wenn man nun beide Objekte gleichzeitig genau nach Unnas Vorschrift weiter behandelt, so zeigt sich, daß der Gewebsschnitt wie das Filtrierpapier sich in der gleichen Zeit blau färben, es ist also keine beschleunigende Wirkung der Gewebsoxydase im Verhältnis zur gewöhnlichen Luftoxydation bemerkbar, man müßte denn annehmen, daß auch im Filtrierpapier sich ähnliche oxydierende Fermente befänden, was freilich ein Unding ist. Dieser Versuch zeigt vielleicht am deutlichsten, daß die hohe Empfindlichkeit des Leukomethylenblaues gegen molekularen Luftsauerstoff beim Rongalitweiß nur momentan verdeckt ist durch den bedeutenden Über-

schuß an reduzierender Substanz und saurer Reaktion, daß sie aber sofort zutage tritt, wenn diese Faktoren beim Auswaschen im Brunnenwasser ausgeschaltet werden. Auf diese Tatsache ist in letzter Zeit auch von Oelze (10) hingewiesen worden, welcher schreibt: „Färben wir nun ein Stück in destilliertem Wasser eingeweichtes Filtrierpapier in Rongalitweiß in der Unnaschen Weise, so dokumentiert sich dieses durch die eintretende intensive Färbung als ein Sauerstoffort ersten Ranges.“ Das wichtigste scheint mir dabei der Befund zu sein, daß sich das Filtrierpapier ebenso rasch färbt, wie der Gewebsschnitt, daß wir also auch umgekehrt nicht berechtigt sind, die Färbung des Gewebsschnittes auf Oxydasewirkung zurückzuführen.

Weiterhin möchte ich mit einigen Worten auf die von Oelze (10) beschriebene „primäre Sauerstoffärbung“ eingehen, da dieselbe auch von mir beobachtet wurde. Oelze schreibt: „Die Schnitte bleiben also nach Unna im Rongalitweiß ungefärbt.“ Gerade das Gegenteil habe ich gefunden. Legt man eine Gefrierschnitte in Rongalitweiß, so sieht man klar und deutlich, daß die Schnitte in der typischen Farbe des Farbstoffes gefärbt wird. Diese Färbung ist nicht etwa schwach, sondern auffällig und kräftig, eigentlich gar nicht zu übersehen. Nach einiger Zeit verschwindet sie wieder . . .“ Bei meinen ersten Versuchen, welche ich vor einem Jahr mit Rongalitweiß ausführte, habe ich bereits ein derartiges Verhalten beobachtet, aber nach dieser Richtung hin nicht weiter verfolgt, da es mir nicht wahrscheinlich erschien, daß sich daraus irgend welche wichtigen Konsequenzen ziehen lassen würden. Nachdem nun von anderer Seite, wie es scheint, diesem Vorgang eine größere Bedeutung beigemessen wird, möchte ich wenigstens eine diesbezügliche Notiz aus meinen früheren Versuchsprotokollen an dieser Stelle wiedergeben.

Versuch: Frische Milz vom Kaninchen; ein Gefrierschnitt kommt auf 2 Minuten in Rongalitweiß B. Es tritt sofort eine leichte Blaugrünfärbung der Pulpa auf, während die Follikel weiß bleiben; nach Ablauf einer Minute ist die Färbung wieder verschwunden.

Daß die Färbung „auffällig und kräftig“ sei, wie dies Oelze gefunden hat, konnte ich nicht beobachten, dieselbe war im Gegenteil so schwach, daß ein klares Bild unter dem Mikroskop nicht zu gewinnen war. Ich verzichtete daher auch des weiteren auf eine mikroskopische Kontrolle dieses Vorganges. Zur Deutung der Erscheinung wären zunächst zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen, einmal könnte es sich handeln um Reste des intra vitam gespeicherten Sauerstoffes, welcher momentan einen Teil des in dem Reagens vorhandenen Leukomethylenblaues zur Oxydation bringt; wahrscheinlicher jedoch scheint es zu sein, daß eben bei der vorhergegangenen Prozedur (Übertragen des

Schnittes in das Rongalitweiß) Spuren von Luftsauerstoff vom Gewebe in irgend welcher Weise gebunden (und vielleicht auch aktiviert) wurden. Daß die Färbung dann alsbald wieder verschwindet, darf nicht Wunder nehmen, nachdem schon oben nachgewiesen wurde, in welch reichlichem Überschuß das reduzierende Rongalit in dem Reagens vorhanden ist. Oelze scheint sich bei seinem Erklärungsversuch der ersteren Anschauung zuzuneigen, wenn er schreibt: „Durch den Sauerstoff, welcher sich in der Schnitte befindet, bzw. welcher durch die in dem Gewebe enthaltenen Fermente aktiviert wird, wird eine entsprechende Quantität der Leukobase in den Farbstoff zurückverwandelt.“ Ob es sich tatsächlich um den bereits in dem Gewebe vor dem Tode vorhandenen Sauerstoff handelt, ließe sich eigentlich nur dann mit Sicherheit entscheiden, wenn es gelingen würde, die ganze Prozedur unter Ausschluß der Luft vorzunehmen, was jedoch praktisch genommen auf fast unüberwindliche Schwierigkeiten stößt.

Ich möchte an dieser Stelle einen Versuch einschalten, der vielleicht geeignet ist, die ganze Erscheinung noch anders zu erklären. Die von Oelze zuerst beschriebene „primäre Sauerstoffärbung“ läßt sich nämlich auch ohne Anwesenheit von lebendem Gewebe gewissermaßen „in vitro“ nachahmen. Als ich mich mit dem chemischen Verhalten des Rongalitweiß näher befaßte, suchte ich unter anderem auch die Wirkung von Wasserstoffsuperoxyd festzustellen und erhielt dabei ein eigenartiges Resultat, wie der folgende Versuch zeigen soll:

Man bringt in ein Reagensglas einige ccm des Unnaschen Rongalitweiß, das man zweckmäßig mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers verdünnt. Gibt man nun dazu aus einer Pipette ca. 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd, so kann man alsbald beobachten, wie eine deutliche grünblaue Verfärbung des Reagens auftritt; diese Färbung bleibt jedoch nicht bestehen, nach 30 Sekunden bis höchstens 1 Minute ist sie verschwunden, an ihre Stelle ist wiederum der leichtgelbliche Farbton des Rongalitweiß getreten. Damit ist jedoch die Reaktion noch nicht beendet. Wartet man nun noch eine weitere Minute, so kann man leicht beobachten, wie sich an der Oberfläche der Flüssigkeitssäule ein intensiv blauer Ring bildet, der sich zusehends nach unten in der Flüssigkeit ausbreitet, bis man endlich nach ganz kurzer Zeit eine tief dunkle Flüssigkeit vor sich hat, welche nunmehr genau der Farbe einer konzentrierten Lösung von Methylenblau entspricht. Gleichzeitig mit dem Auftreten der 2. Bläuung macht sich ein unangenehmer, intensiver Schwefelgeruch bemerkbar. Die ganze Erscheinung zerfällt also in drei wohl getrennte Abschnitte: Zunächst nach dem Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd die primäre Bläuung,

dann folgt ein Moment der totalen Entfärbung, woran sich nach kurzer Zeit die zweite definitive und viel intensivere Bläuung anschließt. Es ist sehr naheliegend, diesen ganzen Vorgang mit der von Oelze beschriebenen „primären und sekundären Sauerstoffärbung“ in Vergleich zu bringen. Die Aehnlichkeit ist noch um so größer, als auch bei dem Versuche „in vitro“ die primäre Bläuung wesentlich schwächer ausfällt, und der erzielte Farbton ein mehr grünlicher ist, als bei der zweiten definitiven Bläuung; es verhält sich nämlich die erste Bläuung zu der zweiten, sowohl was ihre Intensität als auch was den Farbton betrifft, genau so, wie die primäre Sauerstoffärbung eines Schnittes zur sekundären.

Wie wäre nun diese auf den ersten Blick gewiß seltsame Erscheinung des Hin- und Herschwankens eines Farbstoffes zwischen seiner Leukobase und seiner gefärbten Oxydationsstufe zu erklären? Daß das an und für sich sehr leicht oxydierbare Leukomethylenblau durch Zufügen von Wasserstoffsuperoxyd momentan sich oxydiert, ist ja leicht verständlich; ebenso ist es auch begreiflich, daß sich dann das in so großem Überschuß vorhandene Rongalit geltend macht und das eben gebildete Methylenblau nochmals reduziert. Wie erklärt sich aber die nunmehr folgende energische zweitmalige Oxydation? Ich denke, daß hiefür der alsbald auftretende Schwefelgeruch einen wichtigen Fingerzeig geben dürfte, er deutet auf nichts anderes hin als auf eine eingetretene Zersetzung des in dem Reagens vorhandenen Rongalit. Wenn aber der Überschuß an Rongalit vollends unwirksam geworden ist durch den Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd, so ist es ohne weiteres verständlich, daß der umgebende Luftsauerstoff nunmehr seine Wirkung entfaltet und die Leukobase energisch oxydiert.

Wenn wir nunmehr die aus dem Reagenzglasversuche gewonnene Anschauung auf die Reaktion am Schnittpräparat übertragen, so wären hieraus folgende Schlüsse zu ziehen: Der den Schnitt vor dem Einlegen umgebende Luftsauerstoff wird von gewissen Gewebsbestandteilen unter Peroxydbildung aufgenommen. Nun wirkt der Peroxydsauerstoff beim Einlegen des Schnittes auf die Leukobase und bringt dieselbe zum Teil zur Oxydation („primäre Sauerstoffärbung“ nach Oelze). Alsbald macht sich der reduzierende Einfluß des überschüssigen Rongalits geltend: Reduktion. Weiter kann nun zunächst beim Schnittpräparat die Reaktion nicht vor sich gehen, da die minimalen Mengen Peroxydsauerstoffes, welche ein dünner Gewebsschnitt enthält, verbraucht sind; bringt man nun aber den Schnitt in (lufthaltiges) Brunnenwasser, so kann von neuem Peroxydbildung stattfinden, und diese ist nun ihrerseits leicht imstande, die jetzt nur mehr in kleiner Menge im Schnitt vorhandene

Rongalitmenge zu überwinden (sekundäre Sauerstoffärbung). Was aber aus diesen Beobachtungen für die Beurteilung und Wertschätzung der ganzen Unnaschen Reaktion hervorgeht, ist die Tatsache, daß dieselbe durchaus nicht als ein so einfacher und leicht überblickbarer Vorgang anzusehen ist, und daß sie vor allem nicht als eine Oxydase-Reaktion im strengen Sinne aufgefaßt werden darf. Loele (7) gibt in seiner Theorie der Oxydasefärbung folgende Definition:

„Wenn in einem System vorhanden sind:

1. oxydierende Substanzen,
2. Leukoverbindungen, die durch aktiven Sauerstoff in Farbstoffe umgewandelt werden,
3. H_2O_2,

so ist die Oxydation der Farbstoffe abhängig:

1. von der Natur der oxydierenden Substanzen,
2. von der Natur und Konzentration der Leukoverbindung in wässeriger Lösung,
3. von der Konzentration des H_2O_2 (starke Lösungen hemmen),
4. von der Temperatur,
5. von der Anwesenheit chemischer Körper, die an sich nicht oxydieren, aber selbst leicht oxydierbar sind (Aldehyde, Phenole),
6. von der Anwesenheit anderer chemischer Körper (Salze, Alkohole usw.).“

Nun enthält aber das Unnasche Reagens eine Leukoverbindung, die zu ihrer Oxydation nicht des aktivierten Sauerstoffes bedarf, sondern schon durch den molekularen Luftsauerstoff zum Farbstoff umgewandelt wird; daneben befindet sich in der gleichen Lösung in starkem Überschuß eine stark reduzierende Substanz, das Rongalit; es ist klar, daß durch diese Kombination die Beurteilung des ganzen Vorganges sehr erschwert wird. Dennoch möchte ich mich nicht der radikalen Anschauung Oelzes anschließen, der „die ganze Rongalitweißfärbung für eine einfache Färbung durch Methylenblau“ hält. Jedenfalls sind die beiden Erscheinungen der primären und sekundären Bläuung streng auseinanderzuhalten in Hinsicht auf ihr Zustandekommen. Die Möglichkeit, daß die primäre Bläuung durch einen fermentativen Prozeß zustande kommt, scheint mir wohl diskutabel; dagegen dürfte die sekundäre Bläuung in dieser Richtung nicht gut verwertbar sein, da der Reagenzglasversuch gezeigt hat, daß das Rongalit durch peroxydartige Verbindungen jedenfalls eine tiefgreifende Umwandlung erfährt, so daß nunmehr die Leukobase leicht oxydiert werden kann.

Es sollen nun noch einige andere Färbungsresultate mit Rongalitweiß besprochen werden: Am frischen Blut läßt sich die „primäre Bläuung“ am schönsten verfolgen; man bringt auf einen Objektträger einen Tropfen Blutes und gibt dazu möglichst wenig Rongalitweiß. Das Ganze wird nun mit Deckglas eingedeckt und umrandet. Man beobachtet sofort schon makroskopisch eine intensive Bläuung. Unter dem Mikroskop zeigt sich alsbald, daß die Bläuung von den gefärbten roten Blutkörperchen herrührt; nur muß auffallen, daß nicht alle Erythrocyten die Farbe angenommen haben, sondern daß ein Teil derselben absolut ungefärbt ist, während andere das tiefste Blau zeigen. An den übrigen Formelementen des Blutes (sowohl Leukocyten wie Lymphocyten) läßt sich nicht die geringste Färbung wahrnehmen, sie sind vielmehr überall als helle glänzende Kugeln zwischen dem ebenfalls leicht blauen Plasma sichtbar. Nach kurzer Zeit kann man nun beobachten, wie das Blau der Erythrocyten immer mehr abblaßt, die reduzierende Wirkung des Rongalits macht sich geltend. Was bei dem Versuche am auffallendsten ist, dürfte die Erscheinung sein, daß sich die Kerne an dem frischen Blutpräparat absolut nicht färben, während doch am frischen Gewebsschnitt gerade die Kernfärbung am augenfälligsten hervortritt. Auffallen muß fernerhin, daß an den Leukocyten keinerlei Granula zur Darstellung kommen. Ich habe nun weiterhin versucht, die Reaktion auch am Blutausstrich zu prüfen. Am unfixierten, nur lufttrockenen Ausstrich läßt sich dieselbe leider nicht durchführen, da alle Elemente sofort von der Unterlage gelöst und fortgeschwemmt werden, wohl aber genügt ein ganz kurzes Formoldämpfen (15 Sekunden) um den Ausstrich genügend am Objektträger haften zu lassen, so daß man die Reaktion samt nachfolgendem, gründlichem Auswaschen genau wie beim Schnittpräparat vornehmen kann. Bei dieser Methode fiel mir vor allem auf, wie ungleich die Resultate an den einzelnen Präparaten angehen, obwohl sämtliche auf die gleiche Weise behandelt wurden. So waren z. B. in der Regel die Erythrocyten gänzlich farblos; dann trat plötzlich an einem Präparate eine ziemlich deutliche, blaugrüne Färbung derselben auf, ohne daß an der Technik der Ausführung etwas geändert worden wäre. Ebenso konnte ich manchmal eine Kernfärbung der Leukocyten beobachten, während sie in anderen Fällen ausblieb. Nur das färberische Bild der Lymphocyten blieb sich stets gleich: Kern ausgespart, nahezu farblos und ohne irgend welche Struktur; Protoplasma als schmaler dunkler Saum sichtbar, von feinsten staubförmigen Granulis erfüllt, mit einzelnen dunkleren größeren Granulis. Bei einigen wenigen Lymphocyten findet man der runden Form eigentümlich aufsitzende halbkugelige Gebilde, die in der Mitte meist eine helle Vakuole er-

kennen lassen (Kunstprodukte?). Es ist mir trotz vieler Bemühungen und zahlreicher Versuche nicht gelungen eine Erklärung für diese eigenartigen Färbungsdifferenzen zu finden; manchmal wollte es mir scheinen, als ob eine Änderung in der Einwirkungsdauer der Formoldämpfe von Einfluß wäre, indem bei möglichster Abkürzung der Formolisierung die Färbung der Erythrocyten begünstigt wurde, doch dürfte dieses Moment jedenfalls nicht bei der wechselnden Kernfärbung der Leukocyten in Betracht kommen, so daß ich es vorziehe, auf Erklärungsversuche in dieser Hinsicht zu verzichten.

Jedenfalls werden die mitgeteilten Resultate geeignet sein, auch in dieser Hinsicht zu großer Vorsicht in der Verwertung der Unnaschen Rongolitweiß-Methode zu mahnen.

Den „Sauerstofforten an Formalinpräparaten“ hat Unna in seiner Arbeit ein eigenes Kapitel gewidmet. Ich möchte auch hierzu einige Bemerkungen machen, da ich bei der Nachprüfung vielfach zu widersprechenden Resultaten gelangte. So heißt es in dem Versuchsprotokoll S. 22: „Organe des Kaninchens: Sofort nach dem Tode in Formalin gelegt. Nach 5—6 Stunden mit CO_2-Schnee vereist und geschnitten, 2 Minuten in Rongalitweiß. Niere: Stark gebläut sind die Kerne der Glomeruli, der geraden Harnkanälchen und der Schleifen. Dagegen sind die Epithelien der gewundenen Harnkanälchen und deren Kerne nahezu farblos. Daher treten bei schwacher Vergrößerung die Nierenpapille und die Glomeruli blau hervor, während die Rinde im allgemeinen farblos und nur abwechselnd blau gestreift erscheint. Erythrocyten ungefärbt.“

Dagegen erzielte ich an der Niere des Kaninchens nach Formalinfixierung nahezu das Gegenteil: Schon makroskopisch fiel an dem Schnitt der Kontrast zwischen der fast farblosen Papille (vgl. Unna) und der blauen Rinde auf. Mikroskopisch zeigte sich, daß sämtliche Sammelkanälchen fast ungefärbt waren, während die in den Kapillaren gelegenen, vereinzelten Erythrocyten tief blaugrün tingiert waren (dagegen Unna: Erythrocyten ungefärbt!). Man könnte nun vielleicht annehmen, daß die Niere bei meinem Versuch nicht lange genug in Formol fixiert war; dies trifft jedoch nicht zu. Auffallend ist ferner die Tatsache, daß in den größeren Blutgefäßen der Nierenrinde die Erythrocyten keine Farbe angenommen hatten. Hingegen sahen an einem formolfixierten Lebergefrierschnitt die Kapillaren wie injiziert aus von den dunkelblau-grün gefärbten Blutkörperchen. Was das verschiedene Verhalten der Erythrocyten in Nierenpapille und in den Gefäßen der Rinde betrifft, so möchte ich noch bemerken, daß sich bei längerem Verweilen des Schnittes in Brunnenwasser eine eigentümliche „Verschiebung des Farbstoffes in der Weise geltend macht, daß nunmehr derselbe aus den Erythrocyten heraus in das

umgebende Gewebe diffundiert und hier eine deutliche Kernfärbung hervorruft, während in den Kapillaren der Papille jetzt kein einziges gefärbtes rotes Blutkörperchen mehr zu sehen ist. Dagegen bemerkt man in der Nierenrinde, daß die vorher ungefärbten Erythrocyten der großen Gefäße nun einen schön grünen Farbton angenommen haben. Über die formolfixierte Milz schreibt Unna: „Protoplasma der Milzzellen stark blau, Kerne ungefärbt. Stärkste Färbung in den Milzknötchen. Erythrocyten ungefärbt."

Auch hier erhielt ich abweichende Resultate. Wenn man die Milz noch während des Auswaschens in Wasser bei Lupenvergrößerung betrachtet, so fallen ohne weiteres die Milzfollikel als helle Punkte auf. Bei mikroskopischer Untersuchung bestätigt sich, daß gerade die Milzfollikel am schwächsten gefärbt sind. Als dunkle Punkte treten in ihnen nur die wiederum tief dunkelblaugrünen Erythrocyten hervor. Bei längerem Verweilen in Wasser macht sich die gleiche „Verschiebung" bemerkbar: Die Erythrocyten haben ihre intensive Farbe abgegeben und die Lymphocyten sind jetzt so stark tingiert, wie dies bei einer gewöhnlichen Methylenblaufärbung der Fall ist. Ich glaube daraus schließen zu dürfen, daß das Methylenblau während der Wasserbehandlung des Schnitts die eigentlichen Orte seiner Entstehung verläßt und durch Diffusion in diejenigen Gewebsbestandteile gelangt, zu welchen es chemische Affinitäten besitzt. Es ist dies gewiß ein weiterer Punkt, welcher zu großer Vorsicht in der Bewertung der mit Rongalitweiß erzielten Resultate mahnt.

Das Ergebnis dieser Versuche veranlaßte mich ferner, zu prüfen, inwiefern etwa der Blutgehalt der Organe die Reaktion beeinflußen könnte. Ich wurde dabei vor allem von dem Gedanken geleitet, daß wiederholtes Gefrierenlassen und wieder Auftauen das Blut lackfarben macht; mit anderen Worten: daß das Hämoglobin aus den Blutkörperchen austritt, eine Tatsache, die ja der Physiologie längst bekannt ist. Da nun die zu untersuchenden Organe auf dem Gefriermikrotom einem solchen Prozeß unterworfen werden, so schien es mir wohl berechtigt zu prüfen, ob dabei Hämoglobin in die Gewebe diffundiert, dieselben imprägniert, und so etwa oxydierende Eigenschaften der Gewebe vortäuscht, welche in Wirklichkeit auf Kosten des Hämoglobins zu setzen sind. Zur Entscheidung dieser Frage wurde einem eben getöteten Kaninchen eine Kanüle in den linken Ventrikel gebunden und nach Eröffnung des rechten Vorhofes unter konstantem Druck eine auf Körpertemperatur erwärmte physiologische Kochsalzlösung so lange eingeleitet, bis die ausströmende Flüssigkeit keine Blutreaktion mit Guajaktinktur und H_2O_2 mehr gab. Die Arteria renalis der einen Seite war zuvor unterbunden worden, um die eine Niere als bluthaltiges Organ in Vergleich ziehen zu können. Nach Beendigung

der Durchspülung wurden Gefrierschnitte von beiden Nieren mit Rongalitweiß gefärbt, es ergab sich jedoch keine Differenz. Die Gefriermethode ist also auch in dieser Hinsicht als einwandfrei zu bezeichnen, nachdem schon von anderer Seite nachgewiesen wurde, daß das Gefrierenlassen die Oxydasewirkung nicht schädigt.

Zusammenfassung.

Aus den mitgeteilten Beobachtungen geht hervor, daß das Unnasche Reagens unter Umständen wohl geeignet ist, neue Aufschlüsse nach verschiedener Richtung hin zu bieten, daß man jedoch in der Verwertung der damit erzielten Resultate möglichst vorsichtig und kritisch vorgehen möge. Die Anfangs gehegte Erwartung, daß das Rongalitweiß ein neues Oxydasereagens darstellt, hat sich nicht erfüllt.

Die größte Schwäche des Reagens liegt in der Verwendung eines Farbstoffes, der zum lebenden wie zum toten Gewebe ausgesprochene Affinitäten besitzt.

Die große Empfindlichkeit des Leukomethylenblaues gegen Luftsauerstoff ist nur verdeckt durch den Überschuß an reduzierender Substanz, die ihrerseits wieder in ihrer Wirkung auf den Ablauf der ganzen Reaktion nur eine weitere Komplikation darstellt.

Insbesondere bei der sekundären Bläuung des Schnittes im Wasser läßt sich oftmals unter dem Mikroskop unschwer eine „Verschiebung“ des Farbstoffes verfolgen, indem derselbe nachträglich durch Diffusion diejenigen Orte aufsucht, welche Methylenblau überhaupt bevorzugt.

Es scheint, daß die Reaktion unter sonst gleichen Bedingungen nicht immer das gleiche Resultat gibt; so decken sich die von Unna an Formalinpräparaten erzielten Bilder nicht mit den auf Seite 25 von mir mitgeteilten Befunden.

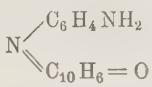
Die Schultzesche Oxydasereaktion.

Zum Vergleiche sei hier kurz die bekanntere Schultze-Winklersche Oxydasereaktion herangezogen, um zu zeigen, daß dieselbe sehr wohl den im allgemeinen Teil aufgestellten Forderungen entspricht.

An erster Stelle war daselbst verlangt worden, daß das Reagens dem molekularen Luftsauerstoff gegenüber indifferent sei oder wenigstens nur sehr langsam durch denselben oxydiert werde. Dieser Forderung wird das Schultzesche Reagens in hohem Maße gerecht. Es beruht nämlich auf der

oxydativen Synthese von Indophenolblau aus α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin. In dem Reagens ist somit zunächst auch noch nicht die Leukoverbindung des Indophenolblaues vorhanden, woraus sich seine große Unempfindlichkeit gegenüber Luftsauerstoff erklärt. Zur Synthese bedarf es einer Spaltung des molekularen Luftsauerstoffes (O_2) in seine Atome -O-O-; die Synthese der Leukoverbindung kommt durch den Eintritt eines O-Atomes zu stande, während das zweite O-Atom dann erst zur Oxydation zu Indophenolblau verwendet wird. Dieser Prozeß geht unter Einwirkung der Luft nur äußerst langsam vor sich, wird aber durch die oxydierenden Fermente sehr beschleunigt.

Die zweite Grundbedingung für ein Reagens auf Oxydase ist die, daß der verwendete Farbstoff keine spezifischen Gewebsaffinitäten besitzen darf. Auch dieser Bedingung entspricht das Indophenolblau (von seiner Eigenschaft als Fettfärber soll weiter unten die Rede sein). Das Indophenolblau besitzt die Formel



es ist ein amphoterer Monochinonfarbstoff und besitzt als solcher keine chemischen Affinitäten zum Eiweiß, wohl aber kommt ihm als solchem die Fähigkeit zu, Fett physikalisch zu färben.

Gerade hierin liegt meines Erachtens ein weiterer Vorzug dieses Farbstoffes für seine Verwendung als Oxydasereagens. Es war oben im allgemeinen Teil auf die bemerkenswerten Untersuchungen von Overton hingewiesen worden, welcher zeigte, daß die Oxydasewirkung an Lipoidsubstanzen gebunden sei. Aus eben diesem Grunde ist das Lipoidfärbungsvermögen des Indophenolblaues nicht als Nachteil zu betrachten (Dietrich), sondern zu begrüßen. Der letzten im allgemeinen Teil aufgestellten Forderung kann jederzeit dadurch entsprochen werden, daß man stets frisch bereitete Lösungen verwendet. Es soll an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, daß es als ein sehr fraglicher Vorteil betrachtet werden muß, wenn empfohlen wird mit alten Lösungen zu arbeiten, da diese „besser färben“. Der Gehalt alter Lösungen an Peroxyden kann nicht ohne weiteres erkannt werden, und es kann daher leicht der Fall eintreten, daß die Wirkung der Oxydase durch das System Peroxydase + Peroxyd vorgetäuscht wird.

Es zeigt sich also, daß die Indophenolblaureaktion in allen Punkten den Forderungen entspricht, die an ein Oxydasereagens gestellt werden müssen.

Seither sind auch schon zahlreiche interessante Ergebnisse durch dieselbe zu Tage gefördert worden. Ich möchte in dieser Hinsicht einige Befunde

mitteilen, welche sich mir nebenbei während meiner Beschäftigung mit dem Wesen dieser Reaktion ergaben. Vorher möchte ich noch erwähnen, daß ich mich bei meinen Versuchen stets der Modifikation nach Gierke bediente (derselbe verwendet bekanntlich eine Mischung der zwei Lösungen von α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin in physiologischer Kochsalzlösung ohne Alkalizusatz). Bei der Wahl dieser Modifikation ließ ich mich von dem Gedanken leiten, daß die Oxydasereaktion eine Art Supravitalfärbung darstellt und daß es daher wünschenswert erscheint, Lösungen zu verwenden, welche die Lebensfunktionen der Zellen nach Möglichkeit schonen. Hierzu dürfte sicher die physiologische Kochsalzlösung und insbesondere der Mangel des Alkalis am günstigsten sein. Daß sich in der Kochsalzlösung nur minimale Spuren beider Substanzen lösen, kann sicher nicht als Nachteil betrachtet werden, wenn man bedenkt, welch geringe Farbstoffkonzentrationen bei der Supravitalfärbung eine ausgiebige Tinktion der zelligen Elemente bewirken.

Nach den Literaturangaben sollen die Lymphocyten keine Oxydasereaktion geben, ich fand diese Angabe nicht bestätigt in dem folgenden Versuch: Lymphdrüse vom Meerschweinchen; ein kleines Stück derselben wird auf dem Objektträger in einem Tropfen der Oxydasemischung nach Gierke zerzupft und dann mit einem zweiten Objektträger unter sanftem Druck zerquetscht. Der erhaltene Brei wird mit einem Deckglas eingedeckt und mit Immersion untersucht. Resultat: Alle Lymphocyten zeigen nach kurzer Zeit ganz vereinzelte dunkelblaue Granula. Die Zahl der Granula eines Lymphocyten schwankt am häufigsten zwischen 4—8, seltener mehr als 10—12, so daß dieselben stets ohne Mühe gezählt werden können. Ihre Größe ist nicht konstant (feinste und etwas größere), die Form stets kugelig. Es ist mir nicht gelungen, in der bisherigen Literatur einen ähnlichen Befund beschrieben zu finden.

Ferner möchte ich noch folgendes Resultat erwähnen: Blutausstrich vom Menschen, luftgetrocknet, ohne Formoldämpfung; Zusatz eines Tropfens Oxydasereagens nach Gierke, Deckglas, Betrachtung mit Immersion. Alle Leukocyten zeigen momentan eine ausgiebige Granulierung, die sich im Verlauf von 5 Minuten noch wesentlich verstärkt. Die Granula sind von verschiedener Größe. Auffallend: die in der nächsten Umgebung eines Leukocyten gelegenen Erythrocyten sind auf der demselben zugekehrten Seite wie bestäubt von feinsten Granulis. Es macht den Eindruck, als ob die kleineren Granula den Leukocytenleib verlassen hätten, um sich an der Oberfläche der nächst gelegenen Erythrocyten anzuheften. Weiter entfernt gelegene rote Blutkörperchen zeigen nirgends diese Bestäubung mit Granulis. Nach 10 Minuten ist die

Granulafärbung der Leukocyten so intensiv, daß einzelne Granula nur mit Mühe isoliert erkannt werden können. Der Kern, der vorher als helle Lücke in seiner polymorphen Gestalt deutlich erkennbar war, läßt sich jetzt nicht mehr auffinden.

Ich habe diese Nebenbefunde angeführt, da sie, wie es scheint, bisher noch nicht beobachtet wurden; aus eben diesem Grunde möchte ich es jedoch auch unterlassen, daraus irgend welche Schlüsse nach einer bestimmten Richtung hin zu ziehen.

Die Indigoreaktion.

Wenn ich in Folgendem über einige Versuche berichte, welche ich mit dem Reduktionsprodukt des Indigo am tierischen Gewebe anstellte, so möchte ich vorher feststellen, daß es nicht meine Absicht ist, damit ein neues Oxydasereagens in die Technik einzuführen; es ist mir dabei lediglich darum zu tun, meine oben aufgestellte Behauptung, daß bei Oxydase-Reagentien die indifferenten und amphoteren Farbstoffe in erster Linie in Betracht kommen, an dem Beispiel des Indigo nochmals zu begründen. Ich bin mir dabei wohl bewußt, daß der Indigo im strengen Sinne des Wortes nicht zu den indifferenten Farbstoffen zu zählen ist; wenigstens wenn man seine chemische Konstitution ins Feld führt, könnte darauf hingewiesen werden, daß derselbe zwei basenbildende NH-Gruppen enthält. Es wurde jedoch bereits früher im allgemeinen Teil gezeigt, daß das Indigoblau keinerlei Fähigkeiten zeigt, mit Säuren Salze zu bilden. Die beiden NH-Gruppen sind also in diesem speziellen Falle wohl als indifferente Gruppen zu bezeichnen. Auch sonst hat der Indigo mit den Fettfärbern mancherlei gemeinsam: Er ist in Wasser unlöslich, dagegen in fettlösenden Medien, z. B. Chloroform mit blauer Farbe leicht löslich; was das Indigoblau als solches für die Fettfärbung aber unbrauchbar macht, ist meines Erachtens nur der Umstand, daß derselbe sich in Alkohol nicht löst. (Bekanntlich werden die in der Technik verwendeten Fettfärber in der Weise angewandt, daß man sie in geringprozentigem Alkohol löst, welcher zwar die betreffenden Farbstoffe genügend zu lösen vermag, aber auf die Neutralfette noch keine lösende Wirkung ausübt.) Es steht uns also für das Indigoblau mit anderen Worten kein lösendes Medium zur Verfügung, welches seinerseits wiederum das Fett unbehelligt läßt.

Anders beim reduzierten Indigo, dem Indigoweiß; dieses ist in Wasser bei alkalischer Reaktion leicht löslich und kann in dieser Form den Zellen der Gewebe leicht zugeführt werden. Nun steht aber der Verwertung einer

Reaktion mit Indigo ein anderes Bedenken entgegen, welches den Wert derselben sehr fraglich macht: Das Indigoweiß ist nämlich dem molekularen Luftsauerstoff gegenüber sehr empfindlich, es oxydiert sich momentan bei der Berührung mit Luft, entspricht also nicht der ersten der im allgemeinen Teil aufgestellten Forderungen. Bringt man z. B. einen Gewebsschnitt in eine Lösung von Indigoweiß und nachher zum Zwecke der Auswaschung und Oxydation in Wasser, so bedeckt sich der Schnitt schon während des kurzen Übertragens durch Luft derartig mit Niederschlägen, daß eine Verwertung zur mikroskopischen Untersuchung ausgeschlossen ist. Ich suchte nun diese Schwierigkeit dadurch zu umgehen, daß ich einerseits eine vorzeitige Oxydation zunächst durch Fernhalten von Sauerstoff hintanhielt, andererseits eine wertvolle Eigenschaft des Indigo ausnützte, daß er nämlich keine chemischen Affinitäten zum Gewebe besitzt. Wenn man z. B. einen mit Indigoweiß durchtränkten Schnitt unter strengem Ausschluß von Sauerstoff nachträglich auswäscht, so zeigt sich, daß das Indigoweiß tatsächlich nicht vom Gewebe zurückgehalten wird, mit Ausnahme von gewissen Granulis, welche mir mit den Indophenol-Oxydase-Granulis identisch zu sein scheinen.

Es soll zunächst nun die Technik der Ausführung genau beschrieben werden, da sie mit mancherlei Schwierigkeiten zu kämpfen hat.

Die hierzu nötige Indigoküpe bereitete ich nach einer von den Höchster Farbwerken in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellten Vorschrift: 50 g Indigo M. L. B. Teig (20 prozentig) werden mit ca. 500 ccm heißem Wasser (50—60 Grad) angeteigt, 15 ccm Natronlauge von 40 Grad Bé. zugegeben und dann langsam 13—15 g Hydrosulfit konzentriert unter Rühren eingestreut; in 15 Minuten ist die Verküpung beendet. Es erwies sich als vorteilhaft, die ziemlich konzentrierte Küpe mit etwa 5 Teilen Wasser, dem eine Spur Hydrosulfit zugesetzt war, zu verdünnen.

Da sich auf der Lösung sofort der bekannte „Spiegel“ von oxydiertem Indigo bildet, so ist es, wenn man Niederschläge vermeiden will, nicht angängig, die Schnitte direkt in die Lösung einzulegen; nach verschiedenen Versuchen gelangte ich zu folgendem Verfahren: Der Gefrierschnitt wird direkt vom Messer des Mikrotoms weg auf dem Objektträger aufgefangen, so daß er möglichst glatt liegt. Es soll dabei nicht verschwiegen werden, daß es viel Mühe und auch dann noch zahlreiche Schnitte kostet, bis es gelingt, einen derselben glatt auf den Objektträger zu legen. Das Organ darf weder zu wenig noch zu stark gefroren sein, damit der Schnitt ausgebreitet und nicht gerollt von der Schnittkante des Messers herabhängt und so aufgefangen werden kann. Hat man dies erreicht, so bleibt der Schnitt kurze Zeit auf

dem Objektträger liegen, bis er fast beginnt zu trocknen. Doch muß dies letztere vermieden werden. Der Schnitt haftet dann so fest am Glas, daß er bei den folgenden Prozeduren meist nicht mehr abgeschwemmt wird.

Nun führt man eine feine Pipette in die Indigoweißlösung unter den bedeckenden oberflächlichen Spiegel und gibt rasch einige Tropfen der Küpe auf den Schnitt; sofort bildet sich hier wieder die metallisch-glänzende Haut von oxydiertem Indigo, aber nur an der Oberfläche des Tropfens, während der tiefer am Glas haftende Schnitt nicht dadurch verunreinigt wird. Nachdem man die Küpe ca. 30—40 Sekunden hat einwirken lassen, gilt es nunmehr eine doppelte Schwierigkeit zu überwinden: Einmal muß der Schnitt unter Umgehung der Luft behufs Auswaschung in ebenfalls luftfreies Wasser gelangen. Zweitens muß der über dem Schnitt befindliche Spiegel von oxydiertem Indigo so abgehoben werden, daß er sich dabei nicht auf das Gewebe niederschlägt und dasselbe verunreinigt. Beides läßt sich durch folgende Anordnung erreichen: Man füllt eine Petrischale mit destilliertem Wasser, dem eine Spur von Hydrosulfit zugesetzt ist, nun bringt man den Objektträger samt dem auf ihm befindlichen Quantum der Indigoküpe in genau horizontaler Lage vorsichtig auf das Wasser und läßt ihn darin langsam untersinken; dadurch wird der metallische Spiegel, welcher vorher den Schnitt verdeckte, abgehoben und schwimmt im ganzen auf der Wasseroberfläche, während der Objektträger mit dem anhaftenden, gelblich gefärbten Schnitt auf dem Boden der Petrischale liegt, ohne mit der Luft in Berührung gekommen zu sein. Die Spur von Hydrosulfit im destillierten Wasser hält nun ihrerseits eine vorzeitige Oxydation so lange zurück, bis man den Schnitt nach genügender Auswaschung in lufthaltiges Wasser bringt und endlich der Luft selbst aussetzt, wo sich alsbald die Oxydation des in den Granulis zurückgehaltenen Indigoweiß vollzieht.

Hat man nun z. B. einen Schnitt der frischen Niere (Kaninchen) auf diese Weise behandelt, so zeigt sich bei mikroskopischer Untersuchung mit Immersion, daß die Blaufärbung durch zweierlei Granula hervorgerufen wird:

a) feine hellblaue, eben noch wahrnehmbare Granula, welche das Protoplasma ziemlich gleichmäßig erfüllen; sie liegen so dicht, daß es nur schwer gelingt, ihre Form festzustellen, doch scheinen sie durchweg rundliche Gebilde zu sein;

b) grobe, dunkelblaue Granula von wechselnder Größe, nicht gleichmäßig im Protoplasma verteilt. Sie liegen in den Tubuli contorti im basalen Teil der Epithelzellen, in den Sammelkanälchen mehr um den Kern konzentriert. Das Mark zeigt gegenüber der Rinde auffallend wenige Granula, Glomeruli

fast ungefärbt, doch fallen in ihnen einzelne grobe, dunkel schwarzblaue Granula auf, die anscheinend regellos verstreut liegen. Die Zellkerne sind durchweg ungefärbt, sie erscheinen als helle Bläschen.

An weiteren Organen wurde die Reaktion nicht erprobt, da ich dieselbe nur von rein theoretischem Standpunkte aus für interessant hielt; für praktische Untersuchungen möchte ich sie wegen der ihr anhaftenden Mängel nicht empfehlen, umsomehr als uns in der Indophenolreaktion eine viel elegantere Methode zur Verfügung steht.

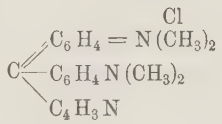
Anhang.

Über Vitalfärbung mit sauren Vitalfarbstoffen.

Die Vitalfärbung kann wohl mit Recht als die älteste histologische Untersuchungsmethode bezeichnet werden; leider mußte sie vor der viel rascher sich entwickelnden Technik der Färbung fixierter Objekte für längere Zeit in den Hintergrund treten, bis endlich durch Ehrlich von neuem auf ihren hohen Wert hingewiesen wurde. Seither haben sich zahlreiche Forscher auf diesem Gebiete betätigt und eine beträchtliche Zahl von neuen Resultaten zu Tage gefördert. In neuester Zeit wurde das Gebiet der Vitalfärbung um einen bemerkenswerten Punkt bereichert: Während man bisher der Ansicht war, daß sich zur Vitalfärbung nur gewisse basische, aber niemals saure Farbstoffe eignen, hat neuerdings die Ehrlichsche Schule gezeigt, daß auch einige saure Farbstoffe vorzügliche vitalfärbende Eigenschaften besitzen.

Die folgenden Versuche befassen sich mit den Farbstoffen Trypanblau, Neuvitalrot und Pyrrolblau.

Zunächst möchte ich bezüglich des Pyrrolblaues bemerken, daß über dessen chemische Konstitution noch recht wenig bekannt zu sein scheint; dies geht schon aus vielen widersprechenden Angaben in der Literatur hervor. Zwar gibt Goldmann (23) in seiner ersten diesbezüglichen Mitteilung folgende Formel des Pyrrolblaues



und bemerkt dazu, daß er nach Ehrlichs Angaben durch Kondensation von Tetramethyldiaminobenzhydrol und Pyrrol entsteht. Er faßt daher auch das Pyrrolblau (wohl auf Grund obiger Formel) als basischen Farbstoff auf. Im

Gegensatz hierzu stehen die Angaben Pappenheims (24), welcher das Pyrrolblau als einen „sulfosauren Triphenylmethanfarbstoff“ definiert. Desgleichen spricht Nakano (25) von der „sauren Vitalfärbung mit dem oxychromen Trypanblau und Pyrrolblau“. Man sieht aus diesen Angaben deutlich, daß es noch nicht einmal feststeht, ob das Pyrrolblau zu den basischen oder sauren Farbstoffen zu rechnen ist. Wenn ich es trotzdem unternommen habe, dasselbe unter den letzteren aufzuführen, so geschah dies mit Rücksicht auf sein vitalfärberisches Verhalten, welches dem der zweifellos sauren Farbstoffe, Trypanblau und Neuvitalrot, näher steht.

Ebenso wenig ist es mir gelungen festzustellen, ob Pyrrolblau und Isaminblau identisch sind, was ebenfalls nach einigen Literaturangaben angenommen werden muß, während andere Autoren wiederum von beiden als von zwei verschiedenen Farbstoffen sprechen. Auch in diesem Punkte herrscht also noch viel Unklarheit und es werden schon von diesem Gesichtspunkt aus die mit Pyrrolblau und Isaminblau erzielten Resultate nur mit Vorsicht verwertet werden dürfen. Es soll gleich an dieser Stelle vorweggenommen werden, daß ich mit Pyrrol- und Isaminblau fast immer unbefriedigende Resultate erzielte; wie von Goldmann (23) bereits hervorgehoben, fand auch ich, daß die Vitalfärbung oft gänzlich ausbleibt, indem der Farbstoff überhaupt nicht resorbiert wird; dabei scheint mir aber die eine Beobachtung von Wichtigkeit, daß hiefür nicht etwa eine Minderwertigkeit des Farbstoffpräparates verantwortlich zu machen ist, sondern das verwendete Versuchstier. Es läßt sich nämlich mit der gleichen Farblösung, welche bei einem Tier keine Vitalfärbung hervorrief, bei einem zweiten oder dritten eine Färbung erzielen.

Ich möchte nun einige Bemerkungen machen über die genannten Farbstoffe, bezüglich ihres Verhaltens gegen Alkalien und Säuren, ihrer Reduzierbarkeit und besonders ihrer Löslichkeitsverhältnisse in verschiedenen Medien:

a) Pyrrolblau. Alkalien (NaOH) bewirken in stärkerer Konzentration eine rotviolette Fällung, bei einem bestimmten NaOH-Gehalt fällt das Pyrrolblau quantitativ aus, so daß das Filtrat eine wasserklare Lösung bildet. Säuren bewirken keine Veränderung.

Reduktion erfolgt durch alkalisches Hydrosulfit beim Erhitzen, ebenso durch angesäuertes Rongalit. Es bildet sich eine Küpe, d. h. das Reduktionsprodukt ist reoxydierbar.

Löslichkeit: in Alkohol absolutus in geringen Spuren löslich. Absolut unlöslich in Chloroform, Toluol und geschmolzenem Paraffin. Leicht löslich in Formol, in Spuren löslich in Carnoys Fixierung (6 : 3 : 1).

b) Isaminblau stimmt in allen Punkten mit dem Pyrrolblau überein.

c) Trypanblau: Alkalien verändern in starker Konzentration den rein blauen Farbton ins Violette. Säuren ohne Einfluß.

Reduktion erfolgt in alkalischer Lösung durch Hydrosulfit bei Erwärmen, in saurer Lösung durch Rongalit beim Erhitzen. Der blaue Farbstoff läßt sich durch Oxydation nicht wieder herstellen.

Löslichkeit: in Alkohol absolutus, Chloroform, Toluol und geschmolzenem Paraffin absolut unlöslich, leicht löslich in Formol (selbst 40 % ig) absolut unlöslich in Carnoys Fixierung (6 : 3 : 1).

d) Neuvitalrot: Alkalien ohne Einfluß, Säurezusatz vertieft den roten Farbton; viel Säure gibt Niederschlag.

Reduktion erfolgt nicht in alkalischer Lösung durch Hydrosulfit (auch nicht beim Kochen), in saurer Lösung Reduktion durch Rongalit beim Erhitzen.

Löslichkeitsverhältnisse genau wie beim Trypanblau.

Aus diesen Versuchen geht zunächst hervor, daß in der Tat eine Unterscheidung von Pyrrolblau und Isaminblau (wenigstens mit den oben angewandten Mitteln) nicht möglich ist. Des weiteren ergibt sich ein wichtiger Unterschied dieser beiden Farbstoffe gegenüber Trypanblau und Neuvitalrot darin, daß die ersteren Küpen bilden, während letztere bei der Reduktion zerstört werden.

An die Untersuchung der Löslichkeitsverhältnisse ging ich zunächst von dem Gesichtspunkt aus heran, zu prüfen, wie weit die in der histologischen Technik gebräuchlichen Agentien den Farbstoff lösen. Bekanntlich vertragen die mit den beiden letzgenannten Farbstoffen vitalgefärbten Organe alle mit einer Paraffineinbettung verbundenen Prozeduren, wenn sie vorher in Formol fixiert waren. Es muß nun bei den obigen Versuchen ohne weiteres auffallen, daß die Farbstoffe gerade in Formol leicht löslich sind, während sie in Alkohol absolutus, Chloroform und Toluol auch nicht in Spuren gelöst werden. Es erschien mir daher sehr wahrscheinlich, daß auch das Carnoysche Fixierungsgemisch (Alkohol absolut.[6] Chloroform[3] und Eisessig[1]) den Farbstoff nicht lösen könne; in der Tat bestätigte sich diese Erwartung: in Carnoys Fixierungsgemisch lösen sich nicht die geringsten Spuren von Trypanblau und Neuvitalrot. Sollte daher dieses Fixierungsmittel nicht viel geeigneter sein für die vital gefärbten Organe als z. B. Formol, welches den Farbstoff zu lösen vermag? Ich suchte diese Frage durch folgenden Versuch zu beantworten: Die Organe einer mit Trypanblau gefärbten Maus wurden zum Teil in Formol (nach der bisherigen Vorschrift), zum anderen Teil nach Carnoy fixiert und dann beide in gleicher Weise in Paraffin eingebettet. Die mikro-

skopische Untersuchung ergab nun das bemerkenswerte Resultat, daß die nach Carnoy fixierten Schnitte fast nirgends eine Granulafärbung erkennen ließen, der Farbstoff war diffus im Gewebe verteilt die Kontrollschnitte mit Formolfixierung ergaben die gewohnten schönen Bilder einer distinkten Granulafärbung. Aus dem Ergebnis dieses Versuches muß der Schluß gezogen werden, daß das Trypanblau in den Granulis an Substanzen gebunden ist, welche durch Alkohol, Chloroform etc. ausgezogen werden, dadurch wird dem Farbstoff seine Grundlage entzogen und er kann nunmehr in das Gewebe diffundieren. Weiterhin ergibt sich, daß das Formol mit eben diesen Substanzen eine festere Bindung eingeht, so daß sie nunmehr durch Alkohol, Chloroform etc. nicht mehr gelöst werden; vielleicht ist dieses Verhalten geeignet, einige Aufklärungen über die Natur der mit sauren Vitalfarbstoffen dargestellten Granula zu bringen. Schulemann (27, 28) hat sich eingehend mit dieser Frage beschäftigt; ich möchte aus der interessanten Arbeit folgende Sätze wiedergeben: „. . . Nach diesen Betrachtungen wäre also die Urform aller Granula eine labile chemische Gruppe (Rezeptor) des Protoplasmas. Diese tritt nun mit irgend welchen gelösten Stoffen in Reaktion und bildet Sekrete, Pigmente, Granula etc. Nach der Ausstossung wird der gleichfalls dadurch verloren gegangene Rezeptor wieder ersetzt." „. . . . Man kommt demnach zu dem Schlusse, daß die von Goldmann verwendeten Farben sich mit den oben näher gekennzeichneten chemischen Gruppen (gemeint sind die OH-Gruppen) an Rezeptoren anlagern und sie uns sichtbar machen." Zu einer ähnlichen Anschauung gelangt auch Pappenheim (24): „Was die Methode der Vitalfärbung durch saure Vitalfarben zur Darstellung bringt, sind nicht Kunstprodukte, sondern präformierte Substrate, aber nicht Zellsekrete und vor allem nicht echte Granulationen, sondern protoplasmatische Plasmosomen, Chemozeptoren (Chromozeptoren) der Zellen, die erst durch Farbstoffaufnahme in granulärer Form sichtbar gemacht werden, aber keine präformierten echten Granulationen sind. Erst der Rezeptor + aufgenommener Farbstoff erscheint als Granulum." Die Anschauungen stimmen also in dem Punkte überein, daß es sich um keine Färbung echter Granula handelt; sie vermögen jedoch über die Natur der hypothetischen „Rezeptoren" keinen Aufschluß zu geben. Gerade hierin scheint mir jedoch der obige Versuch weiter zu führen. Wenn nämlich eben diese Rezeptoren durch Alkohol, Chloroform und Toluol extrahiert werden, während Formol dieselben zu erhalten vermag, so erscheint es in hohem Grade wahrscheinlich, daß doch auch hier gewisse lipoidartige Substanzen zugrunde liegen. Ich bin mir dabei wohl bewußt, daß diese Anschauung in schroffem Gegensatz steht zu dem Befunde von Goldmann, daß

ausgesprochen lipoide Substanzen, z. B. Nervensubstanz nicht gefärbt werden. Doch scheinen mir diese Gegensätze nicht so absolut unvereinbar, wenn man bedenkt, daß einerseits bei direkter Injektion in den Duralsack dennoch eine Färbung der Nervensubstanz zustande kommt, und daß andererseits unter dem Begriff „lipoid“ immerhin verschiedenartige Substanzen zusammengefaßt werden, sodaß man von ihnen auch ein verschiedenes Verhalten gegenüber Farbstoffen erwarten darf.

In der Annahme, daß wirklich lipoide Substanzen bei der sauren Vitalfärbung wirksam seien, wurde ich auch durch folgenden Versuch gestärkt:

Zwei gleich große weiße Mäuse desselben Wurfes erhielten beide subkutan 0,5 ccm folgender Lösungen: Maus A von einer 1 prozentigen Lösung von Trypanblau in Chloroformwasser (1 : 5 000 000), Maus B von einer 1 prozentigen Lösung von Trypanblau in destilliertem Wasser. Es zeigte sich zunächst, daß bei Maus A die Färbung deutlich rascher und intensiver auftrat als beim Tier B. Nach ca. 2 Stunden wurden beide Tiere getötet, die Organe nach Vorschrift in Formol fixiert und von beiden Tieren genau 10 μ dicke Schnitte angefertigt. Die mikroskopische Kontrolle ergab, daß das Versuchstier A in allen untersuchten Organen deutlich mehr Granula zeigte. Zur größeren Beweiskraft sei noch hervorgehoben, daß von jedem Organ nicht ein, sondern mehrere Schnitte untersucht wurden, stets mit dem gleichen Resultat; es ist also ausgeschlossen, daß etwa durch eine etwas größere Schnittdicke der Granulareichtum bei Tier A vorgetäuscht wurde.

Das Ergebnis dieses Versuchs läßt aber auch noch einen anderen Gedanken aufkommen: ob nicht bei der sauren Vitalfärbung auch die Phagocytose eine gewisse Rolle spielt. Goldmann (23) selbst hat diese Frage in seiner ersten Arbeit aufgeworfen, ihre Möglichkeit aber entschieden zurückgewiesen. Er schreibt: „Endlich muß ich betonen, daß es mir nie gelungen ist, bei Anwendung der blauen Farbstoffe die Granula extrazellulär zu entdecken. Gegen diese Einwände ließen sich wohl die Versuchsergebnisse von Plato (26) ins Feld führen, welcher bekanntlich nachgewiesen hat, daß die vitale Färbung phagozytärer Einschlüsse nur intrazellulär gelingt, daß sie aber versagt, so bald diese Einschlüsse die Zellen verlassen. Aber für die Deutung der von uns dargestellten Granula im Sinne von Plato fehlen alle Anhaltspunkte.“ Ich möchte diesen Ausführungen Goldmanns nur zwei Tatsachen entgegenstellen: 1. das obige Versuchsergebnis, daß ein minimaler Chloroformzusatz die vitalfärberische Kraft des Trypanblaues steigert, und 2. den Befund von Hamburger und de Haan (5), welche gezeigt haben, daß lipoidlösliche Substanzen in infinitesimalen Dosen angewandt (z. B. Chloroform 1 : 5 000 000) die

Phagocytose beschleunigen. Zieht man aus diesen beiden Tatsachen die Konsequenzen, so wird der Gedanke an eine Wirkung der Phagocytose zum mindesten wieder näher gerückt.

Es sollen nun noch zwei Versuche erwähnt werden, welche in mancher Hinsicht lehrreich sind; in der bisherigen Literatur findet man fast durchwegs die übereinstimmende Anschauung, daß es mit den sauren Vitalfarbstoffen nicht möglich sei, irgend welche Leukocytengranula im strömenden Blut nachzuweisen. Ich bin in der Lage über eine Ausnahme hiervon zu berichten.

Versuch: Ein Meerschweinchen erhielt 10 Tage lang je 5 ccm einer 1 prozentigen Lösung von Neuvitalrot in physiologischer Kochsalzlösung subkutan injiziert. Zwei Stunden vor Tötung erhielt dasselbe nochmals 15 ccm auf einmal intraperitoneal. Die relativ große Farbstoffmenge wurde ohne irgend welche Nebenwirkung gut vertragen. Fixierung der Organe in Formol. Paraffinschnitte. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Hodens war auf dem Schnitt der prall gefüllte Plexus pampiniformis getroffen und es konnten hier die Elemente des Blutes an dünnen Schnitten (3 μ) sehr gut untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß alle Leukocyten rote Granula enthielten. Eine Kontrollfärbung nach Giemsa ergab, daß die Neutrophilen außer den vitalgefärbten Granulis (welche mir schon vorher auffallend gering an Zahl erschienen waren) noch zahlreiche vorher ungefärbte Granula enthielten, welche nun durch Azur-Eosin dargestellt wurden. Die Eosinophilien waren dagegen bereits durch das Neuvitalrot maximal in allen Granulis gefärbt. Es scheinen also im vorliegenden Fall die in den neutrophilen Leukocyten dargestellten Granula wohl nicht identisch zu sein mit den echten neutrophilen Granulis, während in den Eosinophilen sich tatsächlich die präformierten α-Granula vital gefärbt hatten. Vielleicht läßt sich dieses abnorme Verhalten damit erklären, daß bei einer starken Überschwemmung des Körpers mit Farbstoff auch Zellen zu dessen Bindung herangezogen werden können, welche unter normalen Verhältnissen dazu nicht befähigt sind. Jedenfalls beweist aber das vorliegende Versuchsresultat deutlich, wie sehr Schulemann (27) im Recht ist, wenn er schreibt: „. . . Infolgedessen kann nie von einer vitalen Wirkung eines Farbstoffes die Rede sein, sondern für jedes vital gefärbte Gebilde ist bei jeder Tierart, jeder Zellkategorie und für wechselnde physiologische Zustände der Zelle seine Natur festzustellen.“ Ich glaube, daß dieser Satz auch bei den sauren Vitalfarbstoffen in Betracht gezogen werden muß.

Goldmann und Schulemann haben weiterhin ihren Versuchstieren abwechselnd roten und blauen Farbstoff injiziert und fanden dabei, daß sich die Granula nicht im Mischton, sondern die einen rot und die anderen blau

färbten. Schulemann sieht hierin eine wichtige Stütze für den chemischen Vorgang bei der Vitalfärbung. Im Anschluß hieran möchte ich folgenden Versuch erwähnen: Ein Meerschweinchen bekommt (genau wie oben) 10 Tage je 5 ccm Neuvitalrot subkutan, am letzten Tage außerdem zwei Stunden vor Tötung 15 ccm Trypanblau intraperitoneal. Bei der Sektion erscheinen alle Organe im violetten Mischton, ein Beweis, daß das zuletzt applizierte Trypanblau gut resorbiert wurde. Mikroskopisch: Überall in den untersuchten Organen nur rote Granula, während das Gewebe einen diffus blauen Farbton zeigt (injiziert man dagegen einem Tier 15 ccm Trypanblau allein ohne vorherige Behandlung mit Neuvitalrot, so findet man nach zwei Stunden bereits überall eine deutliche blaue Granulafärbung). Ich glaube nun aus diesem Versuch schließen zu dürfen, daß in den Zellen des Organismus unter normalen Verhältnissen nur eine beschränkte Anzahl präformierter Substrate (Chemozeptoren) für saure Vitalfarbstoffe vorhanden sind, reichen dieselben nicht aus um das zugeführte Farbstoffquantum zu binden, so müssen erst unter dem gesetzten Reiz neue Rezeptoren gebildet werden (daher auch die Erscheinung der „Hochtreibung"). In vorliegendem Versuch waren offenbar sämtliche zur Verfügung stehenden Rezeptoren momentan bereits durch das Neuvitalrot besetzt, so daß das weiterhin eingeführte Trypanblau nicht gebunden werden konnte und zur diffusen Durchtränkung der Gewebe führte. Eben daraus läßt sich aber auch weiterhin folgern, daß nicht etwa für das Trypanblau andere zpezifische Rezeptoren in den Zellen präformiert vorhanden sind, da diese alsdann durch das vorausgegangene Neuvitalrot unbesetzt geblieben wären.

Endlich soll nun noch einer letzten Erscheinung gedacht werden, welche schon von Goldmann beobachtet, aber wie es scheint nicht weiter verfolgt wurde: daß nämlich die sauren Vitalfarbstoffe vom Darmkanal aus nicht wirksam sind.

Einem Kaninchen wurde acht Tage lang mittels Schlundsonde je 10 ccm Pyrrolblau verabreicht, ohne daß irgend welche Färbung auftrat; da während dieser Zeit auch in den Exkreten des Tieres keine Spur von Farbstoff nachweisbar war, so erschien es mir zunächst schwer verständlich, wo das immerhin beträchtliche Farbstoffquantum hingewandert sei. Am wahrscheinlichsten war von vornherein die Annahme, daß der Farbstoff im Darmkanal in weitgehender Weise abgebaut und in farblose Stufen übergeführt wird. Wenn man allerdings in Betracht zieht, wie indifferent sich gerade diese Farbstoffe gegen Säuren und Alkalien verhalten und wie schwer sich dieselben zum Teil selbst durch starke Reduktionsmittel reduzieren lassen, so möchte man fast

an einer derartigen Leistung der Darmschleimhaut zweifeln. Ich stellte daher folgenden Versuch an:

Von den zu prüfenden Farbstoffen Trypanblau, Neuvitalrot und Pyrrolblau wurden zunächst je 10 ccm einer 1‰ wässerigen Lösung in Reagensgläser gefüllt und in dieselben ein gleich großes abgewogenes Quantum von fein zerhacktem Dünndarm, Dickdarm und Magen gegeben. Zur Verhütung von Fäulnis wurde jedem Reagensglasinhalt etwas Chloroform zugesetzt. Die einzelnen, verkorkten Gläser blieben sodann bei 37 Grad zwei Tage lang im Brutschrank. Das Resultat ist aus folgender Tabelle ersichtlich.

Darmabschnitt	Farbstoff	Farbe am Ende des Versuchs
Dünndarm	Trypanblau	Helles ockergelb*
Dünndarm	Neuvitalrot	Blaßrot, etwas trüb
Dünndarm	Pyrrolblau	Unverändert, vielleicht etwas heller
Dickdarm	Trypanblau	Graublau, ganz hell
Dickdarm	Neuvitalrot	Blaßrot, etwas trüb
Dickdarm	Pyrrolblau	Gelbgrün*
Magen	Trypanblau	Hellgrau*
Magen	Pyrrolblau	Blau.

Die mit * bezeichneten Farbnuancen sind so hell, daß sie, auf Filtrierpapier getropft, nach dem Trocknen keine Farbe erkennen lassen. Die Beurteilung der Farbwerte wurde in der Weise vorgenommen, daß der Inhalt der einzelnen Reagensgläschen zentrifugiert, abgehebert und in Glasröhrchen von 5 mm lichter Weite gefüllt wurde. Die einzelnen Röhrchen wurden dann mit den Kontrollröhrchen, welche den betreffenden Farbstoff in der Verdünnung 1:1000 enthielten, verglichen. Man sieht aus der Tabelle ohne weiteres, daß die einzelnen Farbstoffe in verschiedenen Darmabschnitten weitgehende Veränderungen erleiden. Ich suchte nun zu ermitteln, ob hierbei etwa fermentative Prozesse wirksam seien. Hierzu wählte ich die Kombination Dünndarm-Trypanblau, weil hier, wie aus der Tabelle ersichtlich, der intensivste Abbau des Farbstoffs stattgefunden hatte. Der vorher feingehackte Dünndarm wurde zwecks Zerstörung der Fermente vorher mit Wasser gekocht, und dann wiederum das abgewogene Quantum mit 10 ccm einer Trypanblaulösung 1:1000 im Reagensglas bei 37 Grad gehalten. Nach zwei Tagen war nunmehr die Lösung noch völlig unverändert, später allerdings zeigte sich eine flockige Ausfällung des immerhin noch rein blauen Farbstoffes. Dieses Versuchsergebnis läßt eine fermentative Wirkung der Darmsäfte auf den Farbstoff sehr wahrscheinlich erscheinen. Es zeigte sich fernerhin, daß frischer Leberbrei sowohl

Trypan- wie Pyrrolblau energisch abbaut. Endlich versuchte ich noch die Einwirkung eines Verdauungsgemisches, indem ich die genannten Farbstoffe in eine 1 prozentige Lösung von Pankreatinum purum activum (Merck) brachte. Das Pyrrolblau wurde auf diese Weise entfärbt, während auf die anderen Farbstoffe kein Einfluß bemerkt werden konnte.

Ich glaube, daß diese wenigen Versuchsergebnisse geeignet sein werden, um gerade in dieser Hinsicht zu weiteren Forschungen anzuregen; sollte es durch spätere Untersuchungen etwa gelingen, nachzuweisen, daß die genannten sauren Farbstoffe ähnlich wie Nährstoffe vom Darmkanal abgebaut und vielleicht sogar in irgend welcher Weise vom Körper verwertet werden, so wird damit auch ihre Wirkungsweise bei parenteraler Einverleibung in ein neues Licht gerückt.

Zusammenfassung.

1. Über die chemische Konstitution von Pyrrolblau und Isaminblau herrscht noch große Unklarheit; vor allem müßte einwandfrei festgestellt werden können, ob es sich um einen basischen oder sauren Farbstoff handelt und ferner, ob Pyrrolblau und Isaminblau identisch sind.

2. Es sind wesentliche Unterschiede im chemischen Verhalten von Pyrrol- und Isaminblau einerseits gegenüber Trypanblau und Neuvitalrot andererseits vorhanden (erstere sind küpenbildend).

3. Als Substrate der mit diesen Farbstoffen dargestellten Granula kommen vielleicht doch lipoidartige Substanzen in Betracht. Auch der Gedanke an Phagocysose ist nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen.

4. Bei intensiver Zufuhr von Farbstoff lassen sich mitunter Zellgranula darstellen, welche bei mäßiger Farbstoffzufuhr ungefärbt bleiben. (Darstellung von Leukocytengranulis durch Neuvitalrot.)

5. Die genannten Farbstoffe werden durch die Darmschleimhaut (bzw. durch die verdauenden Säfte) in weitgehender Weise abgebaut; eine genauere Verfolgung dieser Vorgänge nach physiologischen Gesichtspunkten erscheint gewiß nicht wertlos.

Wenn nun auch die hier zusammengestellten Punkte nicht viel Positives zur Erklärung der Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen beitragen, so glaube ich mich doch auf Grund der obigen Tatsachen berechtigt, darauf hinzuweisen, daß uns die noch überall herrschende Unklarheit zu großer Vorsicht in der Verwertung der Färbungsresultate mahnen muß. Vielleicht ist es zur Zeit noch verfrüht, wenn man behauptet, daß sich nur diese oder jene Zellbestand-

teile mit den sauren Vitalfarbstoffen darstellen lassen, oder wenn man schon jetzt die Methode zur Differenzierung bestimmter Zellkategorien empfiehlt, nachdem sich gezeigt hat, daß eben diese Farbstoffe unter wechselnden Verhältnissen oft doch recht verschieden wirken. Insbesondere möchte ich davor warnen, das Pyrrolblau (Isaminblau) mit den übrigen sauren Farbstoffen in seiner Wirkung ohne weiteres zu identifizieren.

Endlich möchte ich noch hervorheben, daß es wünschenswert ist, in allen Arbeiten, welche sich mit diesem gewiß äußerst interessanten Gebiet befassen, die verwendete Methodik in allen Punkten genau wiederzugeben; nur so wird es möglich sein, durch Vergleichung absolut gleicher Versuchsbedingungen an der Hand langer Reihen festzustellen, was wirklich die einzelnen Farbstoffe leisten. Tschaschin (29) gibt z. B. in seiner Arbeit „über vitale Färbung der Chondriosomen in Bindegewebszellen mit Pyrrolblau“ an, daß er eine 1 prozentige wässerige Pyrrolblaulösung einspritzte (mit der Berechnung von 1 ccm auf je 20 g Körpergewicht). Er erwähnt dagegen mit keinem Wort, wie lange er seine Tiere nach der Injektion leben ließ, und ob er etwa die Injektion am gleichen Tier öfters wiederholte. Und doch sind gerade diese beiden Punkte ebenso wichtig! Nur durch genaueste Angabe der Technik in jedem einzelnen Fall wird es möglich sein, die beschriebenen mannigfaltigen Resultate unter einheitliche Gesichtspunkte zu bringen.

Am Schlusse dieser Arbeit ist es mir ein dringendes Bedürfnis, meinem hochverehrten Lehrer und Chef, Herrn Professor Dr. S. Mollier meinen Dank auszusprechen dafür, daß ich in seinem Institut nunmehr fast zwei Jahre arbeiten durfte und daß er mir stets mit neuen Anregungen gerne zur Seite stand.

Ferner bin ich zu Dank verpflichtet den Firmen Meister Lucius und Brüning und der badischen Anilin- und Sodafabrik für bereitwillige Überlassung von Farbstoffen.

Literaturverzeichnis.

(Die wichtigeren Arbeiten sind mit ihren Titeln aufgeführt.)

1) Bach: „Die langsame Verbrennung und die Oxydationsfermente.“ Fortschr. der naturw. Forschungen 1910, I. Bd.

2) Dietrich: „Naphtholblausynthese und Lipoidfärbung.“ Zentralblatt f. allg. Path. und path. Anat., Bd. 19, 1908.

3) Gierke: „Die oxydierenden Zellfermente.“ Münch. med. Woch. 1911, No. 44.

4) Golodetz und P. Unna jun.: Berl. med. Woch. 1912.

5) Hamburger und de Haan: „Zur Biologie d. Phagozyten.“ Archiv für Anatomie und Physiologie 1913.

6) Klopfer: Zeitschr. f. exper. Path. u. Therapie, 11. Bd., 1912.

7) Loele: „Zur Theorie der Oxydasefärbung.“ Folia häm., Bd. XIV, 1912.

8) Nakano: Folia häm., Bd. XV, 1913.

9) Overton: „Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle.“ Jahrb. f. wiss. Botanik, Bd. 34, 1900.

10) Oelze: „Über die färberische Darstellung der Reduktionsorte und Oxydationsorte in Geweben und Zellen.“ Arch. f. mikr. Anat., Bd. 84, 1914.

11) Pappenheim und Nakano: Fol. häm., Bd. XIV, 1912.

12) Schultze: „Oxydasereaktion an Gewebsschnitten.“ Zieglers Beitr. z. path. An., Bd. 45, S. 127.

13) Schultze: Verhandlungen der deutschen pathologischen Gesellschaft 1909.

14) Schultze: Münch. med. Woch. 1909, No. 4.

15) Unna, P. G.: „Die Reduktionsorte und Sauerstofforte des tierischen Gewebes.“ Archiv für mikr. Anat., Bd. 78.

16) Unna, P. G.: Med. Klin. 1912, No. 22.

17) Unna und Golodetz: Derm. Woch. 1912, Bd. 57.

18) Unna und Golodetz: Monatshefte f. prakt. Dermat. 1910, Bd. 50.

19) Unna und Golodetz: Dermat. Studien, Bd. 22, 1912.

20) Vernon: „Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden.“ Biochemische Zeitschrift 1912, Bd. 47.

21) Winkler: „Der Nachweis von Oxydase in den Leukocyten mittels der Dimethylparaphenylendiamin α-Naphthol-Reaktion.“ Folia häm. 1907, Bd. 4, S. 323.

22) Winkler: Folia häm., Bd. 14.

Literatur zum Anhang.

23) Goldmann: „Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung.“ Beitr. z. klin. Chir., Bd. 64 und 78.

24) Pappenheim und Nakano: „Beiträge über Beziehungen zwischen Vitalfärbung, Supravitalfärbung und Oxydasereaktion.“ Folia häm., Bd. XIV, 1912.

25) Nakano: „Beiträge zur Kenntnis der histologischen Oxydasereaktion der Supravital- und Vitalfärbung.“ Folia häm., Bd. XV, 1913.

26) Plato: „Über die vitale Färbbarkeit der Phagocyten.“ Arch. f. mikros. Anat., Band 56.

27) Schulemann: „Beiträge zur Vitalfärbung.“ Arch. f. mikr. Anat., Bd. 79.

28) Schulemann: Zeitschrift für exp. Path., Bd. 11, 1912.

29) Tschaschin: Folia häm. 1913, Bd. 14, Heft 3.

Lebenslauf.

Geboren zu München am 6. September 1888 als Sohn des Kgl. Professors und Direktors a. D. Konrad Kriegbaum, absolvierte ich im Juli 1908 das Kgl. Luitpold-Gymnasium zu München. Im Oktober 1908 bezog ich die Ludwig-Maximilians-Universität zu München. Nach bestandenem Physikum diente ich beim 1. Infanterie-Regiment. Im Dezember 1913 bestand ich alsdann die ärztliche Hauptprüfung und war hierauf vom 1. Januar bis 1. Mai 1914 an der Kgl. Anatomie und vom 1. Mai bis 1. August 1914 am städt. Krankenhause München-Schwabing als Medizinalpraktikant tätig.

Am 2. August 1914 erfolgte meine Einberufung zur mobilen Armee; seit dieser Zeit bin ich am Garnisons-Lazarett München als Feldunterarzt beschäftigt.